

Université de Montréal

**Rôle du jeûne et de la perturbation de la cascade de
signalisation de l'insuline sur le clivage du précurseur de la
protéine amyloïde (APP)**

par Sara Licea

Département de Neurosciences

Faculté de Médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Neurosciences

septembre, 2016

© Sara Licea, 2016

Résumé

La maladie d'Alzheimer est majoritairement sporadique et peu est connu sur les mécanismes déclenchant le développement de cette forme de la maladie. Les études sur la forme familiale ont attribué une importance particulière à la bêta-amyloïde ($A\beta$), un produit de clivage du précurseur de la protéine amyloïde (APP). Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés comme déclencheurs potentiels du développement de la maladie d'Alzheimer dont le diabète de type II (T2D). En effet, la déficience de la signalisation de l'insuline par la désensibilisation des récepteurs de l'insuline (IR) dans le cerveau semble être une caractéristique commune aux deux maladies. Les effets à long terme de la résistance à l'insuline sur l'accumulation d' $A\beta$ et sur la phosphorylation de Tau ont été étudiés, mais les effets de la perturbation aiguë des IR sont moins bien caractérisés. Aussi, les désordres métaboliques sont également des caractéristiques communes aux deux maladies. Le but de notre étude est de déterminer si la perturbation aiguë des IR peut affecter le clivage de l'APP et si la privation énergétique par le jeûne peut sensibiliser ce clivage à la perturbation aiguë des IR. Pour évaluer ceci, nous avons utilisé la Tyrphostin AG1024 à faible dose pour simuler une perturbation des IR plutôt qu'un blocage complet des récepteurs. Pour quantifier le clivage de l'APP, nous avons mesuré les changements de la quantité d'APP taille pleine totale par immunobuvardage de type Western. Pour s'assurer que les changements de la quantité d'APP taille pleine traduisait bien un clivage, nous avons développé un système de lecture par luciférase. Ce système nous permet de suivre le clivage de l'APP via l'expression de la luciférase Firefly puisque le facteur de transcription GAL4 est lié à la portion C-terminale de l'APP.

Tout d'abord, nous avons observé que la perturbation aiguë des IR par la Tyrphostin mène au clivage de l'APP et que le jeûne augmente la vulnérabilité au clivage de l'APP suite à une plus petite dose de Tyrphostin. Ce clivage serait imputable à la voie amyloïdogénique puisque l'inhibition de la β -secrétase et de la γ -secrétase empêche le clivage de l'APP. Nous avons aussi montré que la perturbation des IR est nécessaire alors que la perturbation spécifique des IGF-1R n'est pas suffisante. De plus, ni l'autophagie, ni les caspases et ni les protéasomes ne semblent impliqués dans le clivage de l'APP suivant la combinaison du jeûne

et de la petite perturbation des IR. L'activité de mTOR n'est également pas requise. Cependant, l'activité de la GSK3 est nécessaire au clivage et semble affecter le clivage par la γ -secrétase. Nous avons ensuite confirmé dans des cultures primaires neuronales que la combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë des IR cause le clivage de l'APP et que la GSK3 est encore une fois fortement active. Ainsi, nos résultats suggèrent que la perturbation de la signalisation de l'insuline tel qu'observé dans le T2D augmente le clivage de l'APP via la voie amyloïdogénique et, donc, contribue à la pathologie de la maladie d'Alzheimer.

Mots-clés : Alzheimer, Diabète, APP, Signalisation de l'insuline, Jeûne, Vulnérabilité, GSK3

Abstract

Little is known about the mechanisms that trigger the onset of Alzheimer's disease (AD), a primarily sporadic disease. Studies on the familial form of AD attributed a particular importance to Amyloid beta ($A\beta$), a cleavage product of the Amyloid precursor protein (APP). Many risk factors have been identified as potential triggers of the development of AD including Type 2 diabetes (T2D). Indeed, the impairment of insulin signaling by the desensitization of insulin receptors (IR) in the brain seems to be a common hallmark of both diseases. The long term effects of IR resistance on the accumulation of $A\beta$ and Tau hyperphosphorylation have been studied, but the acute effects of IR perturbation is less characterized. Also, both diseases show metabolic defects. Our research aimed to determine whether acute perturbation of IR signaling affects APP processing and if starving (energy deprivation) could sensitize this processing to acute perturbation of IR. To assess this, we used small doses of Tyrphostin AG1024 to simulate IR perturbations rather than a complete blockade of the receptors. To quantify APP processing, we measured the change of total full-length APP by Western blot. To ensure that this change reflected APP processing we developed a luciferase based readout system. This system allowed us to monitor the occurrence of APP cleavage via GAL4-UAS Firefly luciferase driven expression because we linked GAL4 transcription factor to the C-terminal region of APP.

First, we showed that IR perturbation with Tyrphostin leads to APP processing and that starving increased IR susceptibility to a smaller doses of Tyrphostin. This APP processing occurs via the amyloidogenic pathway because inhibition of β - and γ -secretase inhibited APP processing. We showed that this processing absolutely requires IR perturbation, while IGF-1R perturbation alone is insufficient. Furthermore, neither autophagy, caspases nor proteasome seemed to be implicated in APP processing following starvation and small IR perturbation. The activity of mTOR is also not required. On the contrary, GSK3 activation is necessary for the processing and seems to affect γ -secretase cleavage. We then confirmed in primary cultured neurons that the combination of acute starvation and small IR perturbation causes APP cleavage and GSK3 is again strongly activated. Taken together, our results suggest that

the impairment of IR signalling seen in T2D increases the processing of APP via the amyloidogenic pathway and thereby contributes to the pathology of AD.

Keywords : Alzheimer's disease, Diabetes, APP, Insulin receptor signaling, Starving, Susceptibility, GSK3

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xix
Chapitre 1 : Introduction.....	1
Maladie d’Alzheimer	2
Prévalence	2
Étiologie.....	2
Progression de la maladie	3
La mémoire	4
Maladie d’Alzheimer familiale et sporadique.....	5
APP (précurseur de la protéine amyloïde) et la cascade amyloïde, cause potentielle de la maladie d’Alzheimer ?.....	10
Le précurseur de la protéine amyloïde (APP).....	10
Clivage non amyloïdogénique par l’alpha-sécrétase	12
Clivage amyloïdogénique par la bêta-sécrétase.....	12
La gamma-sécrétase participe aux deux types de clivage	14
Autres clivages de l’APP (précurseur de la protéine amyloïde).....	15
Fonctions des produits de clivage.....	16
Fonctions du domaine intracellulaire de l’APP (<i>APP intracellular domain</i> – « AICD »)	17
L’A β (bêta-amyloïde) et son agrégation en plaque amyloïde.....	19
Souris transgéniques modèles de la maladie d’Alzheimer	21

Hypothèse de la cascade amyloïde	26
Facteurs supportant l'hypothèse que l'APP (précurseur de la protéine amyloïde) initie la maladie d'Alzheimer.....	28
Problème majeur avec l'hypothèse de la cascade amyloïde	32
Hypothèse revisitée : axe de Tau	36
Traitements pour la maladie d'Alzheimer	39
Diagnostic: les biomarqueurs.....	39
Traitements actuels	41
Les hauts et les bas des vaccins contre l'Alzheimer	42
La maladie d'Alzheimer : une maladie majoritairement sporadique.....	45
L'âge et le sexe sont des facteurs risques de développer la maladie d'Alzheimer.	45
Être porteur de l'allèle ApoE4 augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer.	45
Avoir le diabète, plus particulièrement le diabète de type II, est un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer.....	46
Diabetes Mellitus	47
Histoire et définition	47
Types de diabète	47
Prévalence.....	48
Signalisation de l'insuline et sa résistance dans le diabète	49
Facteurs de risque du diabète de type II.....	52
Prévention ou retardement du diabète de type II	53
Pathophysiologie commune à la maladie d'Alzheimer et au diabète de type II.....	53
Deux maladies amyloïdogéniques	54
L'IAPP (<i>Islet amyloid polypeptide</i>) et A β (bêta-amyloïde).....	55
Problèmes cognitifs chez les patients atteints de diabète de type II	58
La résistance à l'insuline, un phénomène commun à la maladie d'Alzheimer et au diabète de type II	59
Rôle de l'insuline dans le cerveau	60
Traitements d'insuline sur la mémoire des rongeurs	62
Traitements d'insuline sur la mémoire des patients Alzheimer.....	62

IDE (de l'anglais <i>Insulin degrading enzyme</i>)	63
Le diabète potentialise le facteur de risque ApoE4.	64
La maladie d'Alzheimer et le diabète manifestent des défauts dans le métabolisme des lipides.	64
La maladie d'Alzheimer, une neuropathologie métabolique.....	65
Redéfinir la maladie d'Alzheimer : une maladie métabolique menant à une neurodégénération.....	66
Le cerveau diabétique et le cerveau Alzheimer : des cerveaux en carence ou à jeun...	67
Implication de la GSK3 (de l'anglais <i>Glycogen synthase kinase 3</i>) : le pont entre les deux maladies?.....	68
Régulation de l'activité de la GSK3	71
La GSK3 dans le diabète de type II	71
Rôles potentiels de la GSK3 dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer.....	72
La GSK3 peut réguler la transcription de la BACE1 (de l'anglais <i>Beta-site APP cleaving enzyme 1</i>).	72
La GSK3 participe dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.	73
La GSK3 peut phosphoryler l'APP (précurseur de la protéine amyloïde).	73
La GSK3 peut phosphoryler la préséniline.....	74
Hypothèse de recherche et objectifs	74
Chapitre 2 : Article.....	76
Impairment of insulin receptor signalling increases the amyloidogenic processing of the amyloid-precursor protein.....	77
Abstract.....	78
Introduction.....	79
Materials and methods	80
Results.....	82
Discussion.....	87
References.....	90
Figures and legends.....	93
Chapitre 3 : Supplementary Results.....	103

APP cleavage is increased after perturbations of insulin receptor signaling and starving greatly enhances this cleavage in cortical neurons.	104
Materials and methods	104
Results.....	106
Starvation induced susceptibility to APP processing appears partially located at insulin receptor level.....	106
GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) affects γ -secretase cleavage.	106
APP (Amyloid precursor protein) processing induced by the combination of starving and insulin receptor perturbations is independent of proteasome, autophagy or caspase activity.....	107
Phospho-null APP (Amyloid Precursor Protein) mutants modulate basal and induced cleavage without preventing it.	108
APP (Amyloid precursor protein) cleavage is increased after perturbations of insulin receptor signaling and starving greatly enhances this cleavage in cortical neurons... ..	109
Figures and legends.....	110
Chapitre 4 : Discussion	118
La perturbation de la signalisation de l'insuline mène au clivage de l'APP (précurseur de la protéine amyloïde).	120
La vulnérabilité au clivage de l'APP est induite par le jeûne	120
Le jeûne et la signalisation de l'insuline.....	121
L'effet du jeûne sur les caspases, l'autophagie et le protéasome	125
Le jeûne et la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline causent un clivage par la voie classique amyloïdogénique.	127
L'état de phosphorylation de l'AICD (<i>APP intracellular domain</i> – « AICD ») joue un rôle mineur dans le clivage de l'APP (précurseur de la protéine amyloïde) induit par le jeûne et la perturbation des récepteurs de l'insuline.	128
L'activité de la GSK3 (de l'anglais <i>Glycogen synthase kinase 3</i>) est nécessaire au clivage induit par la combinaison du jeûne et de la perturbation de la signalisation de l'insuline par la Tyrphostin.	131
Confirmation des résultats dans des neurones corticaux	135

Futures pistes de recherche	137
Préséniline.....	137
Endocytose.....	139
Conclusion	148
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Mutations causant la maladie d'Alzheimer précoce	6
Tableau II.	Liste de quelques mutations d'APP reliées à la maladie d'Alzheimer	7
Tableau III.	Progression des déficits de mémoire chez des modèles de souris Alzheimer ..	23
Tableau IV.	Observations soutenant le rôle clé du problème homéostatique du métabolisme de l'APP dans l'initiation de la maladie d'Alzheimer	31

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1.	Clivage de l'APP.....	11
Figure 2.	Domaine intracellulaire de l'APP (<i>APP intracellular domain</i> – « AICD »).....	18
Figure 3.	Agrégation de l'A β	20
Figure 4.	Séquence des événements pathologiques majeurs menant à la maladie d'Alzheimer proposée par l'hypothèse de la cascade amyloïde	27
Figure 5.	La protéine Tau et la formation des NFTs (enchevêtrements neurofibrillaires)...	35
Figure 6.	Hypothèse de l'axe de la protéine Tau proposée par Ittner et Götz.....	39
Figure 7.	Un modèle temporel hypothétique intégrant les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer.	41
Figure 8.	Signalisation de l'insuline et la résistance à l'insuline	51
Figure 9.	L'IAPP et l'A β	56
Figure 10.	Relation expliquant potentiellement le lien entre le diabète de type II et la maladie d'Alzheimer.....	69

Chapitre 2 : Article

Figure 1.	Full-length APP decreases following the IR/IGF-IR blockade with Tyrphostin AG-1024. Starving increases the susceptibility of APP cleavage by Tyrphostin AG-1024.....	93
Figure 2.	APP cleavage induced following a combination of starving and a low concentration of Tyrphostin AG-1024 can be monitored by luciferase assay.....	94
Figure 3.	IGF-1R blockade or starvation alone is not sufficient to induce APP cleavage, but starvation increases the susceptibility to a Tyrphostin AG-1024 time dependent increase in APP cleavage.	96
Figure 4.	APP cleavage is dependent on beta- and gamma-secretase activity but not on alpha-secretase activity.	98
Figure 5.	The activation of PI3K during the starvation period increases the susceptibility for a subsequent perturbation in insulin signalling, but has no effect on Tyrphostin mediated	

increases in APP cleavage. This cleavage is also not dependent upon mTOR signal transduction.....	99
Figure 6. GSK3 activation is a requirement for the Tyrphostin AG-1024 induced increase in APP cleavage.	101

Chapitre 3 : Supplementary Results

Figure 11. Important decrease in P-GSK3 is also observed in non-starving conditions with higher Tyrphostin concentration, suggesting that starvation induces a susceptibility to APP processing by IR perturbation. Total IR amounts are increased by starving and might be the cause for the increase in starving induced susceptibility to APP processing. However, insulin application cannot prevent APP cleavage.....	110
Figure 12. GSK3 inhibition does not prevent the reduction of full-length APP.	112
Figure 13. APP processing is independent of proteasome, autophagy or caspase activity....	113
Figure 14. Phospho-null APP mutants modulate basal and induced cleavage without blocking it.	115
Figure 15. APP processing is increased after perturbations of IR signalling and susceptibility to APP processing by IR perturbation is greatly enhanced by a starving period in cortical neurons. P-GSK3 is also affected by the combination of starvation and IR perturbation. GSK3 activity seems to affect APP processing the same way as observed in HEK293, i.e. via γ -secretase activity.	117

Chapitre 4 : Discussion

Figure 16. Modèle explicatif de l'activation de la GSK3 par la perturbation aiguë des IR ainsi que la sensibilisation induite par le jeûne à une petite perturbation des IR.	134
Figure 17. La combinaison du jeûne et de la Tyrphostin diminue fortement la phosphorylation inhibitrice à la Ser21 et à la Ser9 de la GSK3 α et GSK3 β respectivement dans les neurones corticaux.....	136
Figure 18. Représentation schématique de l'endocytose de l'APP et de la BACE1.....	140
Figure 19. Recyclage vésiculaire contrôlé par l'état de phosphorylation de la dynamine.....	142

Figure 20. Modèle explicatif de l'activation de la GSK3 par la combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë des IR sur le clivage amyloïdogénique.	147
--	-----

Liste des abréviations

α -secrétase : Alpha-secrétase

β -secrétase : Beta-secrétase

γ -secrétase : Gamma-secrétase

A β : Bêta-amyloïde

ADAM : de l'anglais *A disintegrin and metalloprotease domain*

AICD : de l'anglais *APP intracellular domain*

Akt : aussi connue sous le nom de PKB – Protéine kinase B

Ala : Alanine

AMPA : de l'anglais *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

AP-4 : de l'anglais *Adaptor-related protein complex 4*

APBA1 : de l'anglais *Amyloid beta precursor protein binding family A member 1*

APBB1 : de l'anglais *Amyloid beta precursor protein binding family B member 1*

APH-1 : de l'anglais *Anterior Pharynx-defective 1*

APLP1/2 : de l'anglais *APP-like protein 1/2*

APP : de l'anglais *Amyloid precursor protein* (précurseur de la protéine A β)

Arf-6 : de l'anglais *ADP-ribosylation factor 6*

ANOVA : de l'anglais *Analysis of variance*

Asp : Acide aspartique

ATP : Adénosine Triphosphate

BACE1 : de l'anglais *Beta-site APP cleaving enzyme 1*

BACE2 : de l'anglais *Beta-site APP cleaving enzyme 2*

BBB : de l'anglais *Blood-brain barrier*

Ca²⁺ : Calcium

CaN : Calcineurine

CAA : de l'anglais *Cerebral amyloid angiopathy* (angiopathie amyloïde cérébrale)

cdc2 : de l'anglais *Cell division cycle protein 2*

cdk5 : de l'anglais *Cyclin-dependent kinase 5*

CSF : de l'anglais *Cerebrospinal fluid*

CTF : de l'anglais *C-terminal fragment*

DAB1 : de l'anglais *Dab reelin signal transducer 1*
 DAF-2 : de l'anglais *DAuer formation-2*
 eIF2 α : de l'anglais *Eukariotic translation initiation factor 2A*
 Erk : de l'anglais *Extracellular signal-regulated kinase*
 FAD : de l'anglais *Familial Alzheimer's disease*
 FDG : de l'anglais *Fluodeoxyglucose (¹⁸F)*
 Fe65 : aussi connue sous le nom de APBB1 – de l'anglais *Amyloid beta precursor protein binding family B member 1*
 FFA : de l'anglais *Free fatty acid*
 GFP : de l'anglais *Green fluorescent protein*
 Glu : Acide glutamique
 GLUT1 : de l'anglais *Glucose transporter type 1*
 GLUT3 : de l'anglais *Glucose transporter type 3*
 GLUT4 : de l'anglais *Glucose transporter type 4*
 Grb2 : de l'anglais *Growth factor receptor-bound protein 2*
 GS : de l'anglais *Glycogen synthase*
 GSK3 : de l'anglais *Glycogen synthase kinase 3*
 IDE : de l'anglais *Insulin degrading enzyme*
 HFD : de l'anglais *High fat diet*
 IGF-1 : de l'anglais *Insulin-like growth factor 1*
 IGF-1R : de l'anglais *Insulin-like growth factor 1 receptor*
 IKK : de l'anglais *I κ B kinase*
 IRM : Imagerie par résonance magnétique
 iPSC : de l'anglais *induced pluripotent stem cells*
 IR : de l'anglais *Insulin receptor*
 IRS : de l'anglais *Insulin receptor substrate*
 JIP : de l'anglais *JNK-interacting protein*
 JNK : de l'anglais *c-Jun N-terminal kinase*
 KPI : de l'anglais *Kunitz-type protease inhibitor*
 Leu : Leucine
 LPR : de l'anglais *Low-density lipoprotein receptor-related*

LTD : de l'anglais *Long-term depression*

LTP : de l'anglais *Long-term potentiation*

Lys : Lysine

MALDI-TOF-MS : de l'anglais *Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight-Mass spectrometry*

MAPK : de l'anglais *Mitogen-activated protein kinase*

MDC9 : de l'anglais *Metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich protein 9*

MEK : aussi connue sous le nom de MKK – *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MKK : de l'anglais *Mitogen-activated protein kinase kinase*

Mint : de l'anglais *Munc18-interacting proteins*

mPLK1 : de l'anglais *Mammalian polo-like kinase 1*

mTOR : de l'anglais *Mechanistic target of rapamycin* aussi connu sous le nom de *Mammalian target of rapamycin*

Nct : Nicastrin

NF- κ B : de l'anglais *Nuclear factor kappa B*

NFTs : de l'anglais *Neuroneurofibrillary tangles* (enchevêtrements neurofibrillaires)

NTF : de l'anglais *N-terminal fragment*

NMDA : N-méthyl-D-aspartique

OX-2 : de l'anglais *OX-2 antigen of thymus derived lymphoid cells*

PCP : de l'anglais *Planar-cell polarity*

PDPK1 : de l'anglais *Phosphoinositide-3 Dependent Protein Kinase 1*

PEN-2 : de l'anglais *Presenilin enhancer 2*

PET : de l'anglais *Positron emission tomography*

PI(4,5)P₂ : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PI(3,4,5)P₃ : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

PI3K : de l'anglais *Phosphoinositide 3 kinase*

PiB : de l'anglais *Pittsburg compound B*

Pin1 : de l'anglais *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*

PKA : Protéine kinase A

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PP1 : Protéine phosphatase 1

PP2A : Protéine phosphatase 2A

PS : Préséniline

PSD95 : de l'anglais *Post-Synaptic Density 95*

Rab-5 : de l'anglais *Ras-related protein Rab-5*

RCAN1 : de l'anglais *Regulator of Calcineurin 1*

ROS : de l'anglais *Reactive oxygen species*

S6K1 : de l'anglais *Ribosomal protein S6 Kinase 1*

sAPP α : APP soluble alpha

sAPP β : APP soluble bêta

SAD : de l'anglais *Sporadic Alzheimer's disease*

SELPG-1 : de l'anglais *Selectin P ligand 1*

SEP : de l'anglais *Superecliptic pHluorin*

Ser : Sérine

Shc : de l'anglais *Src homology domain-containing*

SIK2 : de l'anglais *Salt-induced kinase 2*

siRNA : de l'anglais *Small interfering RNA*

SOS : de l'anglais *Son-of-sevenless*

TACE : de l'anglais *Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme*

Thr : Thréonine

Tyr : Tyrosine

X11 : aussi connu sous le nom de APBA1 – *Amyloid beta precursor protein binding family A member 1*

Wnt : de l'anglais *Wingless-type MMTV integration site family member 1*

We must all face the choice between what is right and what is easy
- Albus Dumbledore

Do or do not, there is no try
- Yoda

What's up doc?
-Bugs Bunny

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à te remercier, Jannic, de m'avoir permis de développer ma curiosité, ma rigueur, ma persévérance et, surtout, de m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles.

Aussi, je remercie les docteurs Fernandes et Di Cristo de leur soutien au fil des années ainsi que d'avoir guidé mes démarches et mes réflexions tout au long de ce processus de recherche.

Catherine et Julie : sans votre soutien aux techniques de laboratoire, ce projet n'aurait, franchement, pas pu arriver à terme.

Quant à vous, Anthony, Émilie, Albert et Nicolas, l'amitié et la camaraderie que nous avons développées au fil des ans me suivront à jamais. Que de belles soirées gourmandes en compagnie de mes petits Français, de téléseries découvertes grâce à Albert et de sages conseils, surtout en statistique, de la part de Nicolas!

Je dois aussi remercier mon père et mon frère qui m'ont permis de déconnecter et d'explorer le monde et sans qui je n'aurais pu supporter le stress des études.

Maman : merci de m'avoir écouté dans mes dérives et d'avoir toujours cru en moi.

Évidemment, je dois aussi remercier mes grands-parents et ma famille montréalaise de m'avoir permis de prendre avec un grain de sel les moments difficiles et de m'avoir permis de manger bien au-delà du budget étudiant! Idem pour ma belle famille qui m'a supporté, encouragé et valorisé tout au long de mon périple montréalais. Merci de vos visites et de votre soutien moral (même lors des colocations avec gens douteux pour raisons de finances étudiantes).

Mes amies, je vous remercie d'avoir accepté et d'avoir compris que, pendant 5 ans, j'étais une éternelle étudiante sans le sou et, surtout, sans temps à accorder, mais de m'avoir soutenu tout de même, en plus d'être fières de mes accomplissements.

Alex, mon amour, merci de m'avoir appuyé depuis le début, d'avoir cru en moi et de me laisser te raconter des trucs complètement incompréhensibles pendant des heures simplement parce que ça me fait du bien. Merci d'avoir été mon partenaire pendant plus de la moitié de nos vies – ainsi que pour la suite.

Jezebel, je te remercie d'avoir été indéfectiblement à mes côtés (littéralement), d'avoir réchauffé mes pieds (et l'âme) en tout temps, tout en t'assurant que ma forme physique soit moindrement maintenue: il faut bien les marcher ces chiens!

Chapitre 1 : Introduction

Maladie d'Alzheimer

Prévalence

La maladie d'Alzheimer était virtuellement inconnue du grand public il y a une quarantaine d'années. Toutefois, la prévalence de cette maladie connut une hausse terrifiante, avec présentement plus de 46.8 millions de personnes atteintes mondialement (Alzheimer's Disease International, 2015). La maladie d'Alzheimer a récemment été caractérisée comme le plus important fléau du 21^e siècle puisqu'il a été estimé que 131.5 millions de personnes seront atteintes de démence mondialement d'ici les 35 prochaines années (Anand *et al.*, 2014; Alzheimer's Disease International, 2015). La maladie d'Alzheimer est la forme la plus commune de démence comptant pour 60% à 80% de la totalité de celles-ci (Alzheimer's Association, 2016). La moyenne d'âge d'apparition de la maladie est de 80 ans pour les hommes et de 83 ans pour les femmes (Helmer *et al.*, 2001; Khanahmadi *et al.*, 2015). Une fois le diagnostic des signes cliniques posé la période moyenne de survie est de seulement 9 ans (Helmer *et al.*, 2001; Farris *et al.*, 2004; Khanahmadi *et al.*, 2015; Maqbool *et al.*, 2016).

Étiologie

La maladie d'Alzheimer se caractérise par une atrophie cérébrale observable de façon macroscopique, plus particulièrement de l'hippocampe, des ventricules et du cortex. Cette atrophie est imputable à la mort des cellules neuronales (Alzheimer's Association, 2016). Le premier à avoir tracé le portrait de la neuropathologie de la maladie d'Alzheimer est Alois Alzheimer, un pathologiste allemand qui lui donna son nom. Alzheimer décrivit cinq caractéristiques neurologiques: (a) des dépôts anormaux focalisés (plaques amyloïdes – *amyloid plaques*), (b) des fibrilles intraneuronales (enchevêtrements neurofibrillaires – *neurofibrillary tangles* – « NFTs »), (c) des anomalies au niveau des vaisseaux sanguins (angiopathie amyloïde cérébrale – *cerebral amyloid angiopathy*), (d) une réactivité gliale

(gliose) et (e) des dépôts lipidiques dans des cellules non neuronales (accumulations lipidiques) (Alzheimer, 1907; Alzheimer *et al.*, 1987; Alzheimer *et al.*, 1995).

Les dix dernières années ont connu une explosion de la recherche sur la détection précoce de la maladie d'Alzheimer puisque la maladie est maintenant considérée comme une maladie cérébrale à progression lente qui commence bien avant que les symptômes cliniques émergent (Alzheimer's Association, 2016). En effet, les changements au cerveau associés à l'Alzheimer auraient lieu au moins une vingtaine d'années avant l'apparition de symptômes cliniques (Alzheimer's Association, 2016).

Les deux intérêts classiques dans les études de la maladie d'Alzheimer sont (a) les plaques amyloïdes et (b) les NFTs. La principale composante des NFTs est la protéine Tau hyperphosphorylée qui s'accumule à l'intérieur des neurones, alors que la principale composante des plaques amyloïdes est la protéine bêta-amyloïde (*Amyloid beta* – « A β ») sous forme de dépôts qui s'accumulent à l'extérieur des neurones. L'A β est un produit du clivage séquentiel du précurseur de la protéine amyloïde (*Amyloid precursor protein* – « APP »).

De nos jours, la maladie d'Alzheimer est caractérisée comme un désordre neurodégénératif multifactoriel (Kumar *et al.*, 2015). Plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant pour tenter d'expliquer le développement de la maladie d'Alzheimer, dont l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy & Selkoe, 2002), l'hypothèse cholinergique (Francis *et al.*, 1999), l'hypothèse de la protéine Tau (Maccioni *et al.*, 2010), l'hypothèse de la neuroinflammation (Floyd, 1999), l'hypothèse du calcium (Khachaturian, 1987; Berridge, 2010), l'hypothèse du stress oxydatif ou de la cascade mitochondriale (Markesbery, 1997) et l'hypothèse métabolique (Finch & Cohen, 1997; Moreira, 2012; Kumar *et al.*, 2015).

Progression de la maladie

La maladie d'Alzheimer progresse suivant trois stades: (a) un stade présymptomatique, (b) un stade prodromique qui inclut des symptômes légers et finalement (c) un stade symptomatique qui inclut la démence (Dubois *et al.*, 2007; Lewczuk *et al.*, 2015). Normalement, le patient constate d'abord des difficultés avec sa mémoire épisodique, puis apparaissent la dysphasie, la dyspraxie et des difficultés visuospaciales ainsi qu'exécutives. Au

fil du temps, la détérioration motrice, la dystonie, la myoclonie et des crises épileptiques causent un profond déclin des facultés cognitives. Ces symptômes sont à l'image de la progression histopathologique qui débiterait dans la région transentorhinale du lobe temporal médial, dans l'hippocampe et les structures parahippocampales avant d'atteindre le lobe pariétal et finalement le cortex cérébral entier (Braak & Braak, 1991; Braak *et al.*, 2006; Braak *et al.*, 2011; Serrano-Pozo *et al.*, 2011; Hertze, 2016).

Les troubles cognitifs légers (*Mild cognitive impairment* – « MCI ») sont une condition souvent identifiée comme un précurseur potentiel de la maladie d'Alzheimer. Cette condition est décrite comme des changements mesurables dans les habiletés de réflexion, souvent notés par la famille et les amis, sans affecter les habiletés de l'individu à effectuer les tâches quotidiennes {Alzheimer's Association, 2016 #626. 15% à 20% de la population au-dessus de 65 ans souffriraient de MCI (Roberts & Knopman, 2013; 2016). Ces personnes sont plus susceptibles de développer des démences incluant la maladie d'Alzheimer (Mitchell & Shiri-Feshki, 2009). En effet, une revue systématique a évalué qu'environ 32% des individus MCI développeront la maladie d'Alzheimer dans les 5 années suivantes (Ward *et al.*, 2013; 2016).

La mémoire

L'apprentissage est le processus par lequel nous développons des connaissances alors que la mémoire est le processus par lequel ces connaissances sont encodées, stockées, puis éventuellement récupérées. La mémoire à long terme peut être divisée en deux catégories en fonction du stockage et du rappel de l'information : la mémoire implicite (non déclarative ou procédurale) et la mémoire explicite (déclarative) (Milner *et al.*, 1998). La distinction principale entre ces deux types se trouve au niveau de la conscience lors du rappel. La mémoire explicite est utilisée lors d'un rappel conscient alors que la mémoire implicite concerne les comportements et les actions qui ne dépendent pas d'un rappel conscient. La mémoire explicite se divise également en deux sous-catégories : la mémoire sémantique (factuelle) et la mémoire épisodique (autobiographique). La mémoire épisodique est la

première affectée par la maladie d'Alzheimer (Hodges & Patterson, 1995; Kandel *et al.*, 2000; Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

Le stockage de la mémoire explicite à long terme utilise le système du lobe temporal médial et la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe serait à la base de cette mémoire. C'est la force de ces synapses qui dicte la mémoire (Bliss & Cooke, 2011). La dépression synaptique à long terme (*Long-term synaptic depression* – « LTD ») et la potentialisation synaptique à long terme (*Long-term potentiation* – « LTP ») sont les changements durables de force synaptique (Bliss & Cooke, 2011). Ces changements sont induits par des motifs précis d'activité synaptique. Simplement dit, la LTP augmente la transmission synaptique et la LTD la diminue et les deux ont des mécanismes d'induction moléculaires différents (Milner *et al.*, 1998; Kandel *et al.*, 2000). La maladie d'Alzheimer est associée à des perturbations de l'apprentissage et de la LTP alors que la LTD est favorisée (Malenka & Bear, 2004; Shankar *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2012)

Maladie d'Alzheimer familiale et sporadique

La maladie d'Alzheimer se divise en deux groupes: (a) maladie d'Alzheimer familiale (*Familial Alzheimer's disease* – « FAD ») et (b) maladie d'Alzheimer sporadique (*Sporadic Alzheimer's disease* – « SAD »). Ces deux divisions sont souvent nommées (a) la forme précoce (*Early onset Alzheimer's disease*) et (b) la forme tardive (*Late onset Alzheimer's disease*) respectivement. D'un point de vue clinique, la forme précoce est généralement associée au cas apparaissant avant 65 ans (Khanahmadi *et al.*, 2015). Cependant, la présentation clinique et la neuropathologie de ces deux formes sont très similaires (Webb & Murphy, 2012). Les FAD sont une forme héréditaire autosomale dominante de la maladie (Webb & Murphy, 2012) qui se caractérise par des mutations menant généralement à une augmentation de la production de la bêta-amyloïde 42 (A β 42), la principale composante des plaques amyloïdes décrites il y a plus de 100 ans par Dr Alzheimer (Suzuki *et al.*, 1994; Maruyama *et al.*, 1996; Webb & Murphy, 2012). Ce serait cette accumulation qui provoquerait le développement des FAD en milieu de vie (Levy-Lahad *et al.*, 1995a; Levy-Lahad *et al.*, 1995b; Borchelt *et al.*, 1996; Scheuner *et al.*, 1996; Borchelt *et al.*, 1997; Selkoe

& Hardy, 2016). Il existe une cinquantaine de mutations de l'APP et plus de 245 mutations dans PS1 et PS2 (préséniline 1/2) (Cacace *et al.*, 2016) (Tableau I et Tableau II). Cependant, la majorité des cas de maladie d'Alzheimer sont sporadiques. En effet, l'une des principales inquiétudes quant à la prévalence de la maladie d'Alzheimer est que les FAD ne compteraient que pour 1% de tous les cas (Webb & Murphy, 2012). Ainsi, les SAD sont bien plus courantes et sa ou ses causes ne sont pas élucidées.

Tableau I. Mutations causant la maladie d'Alzheimer précoce

Gène	Chromosome	Hérédité	Types de mutations	(N)
APP	21q21.1-21q21.3	Autosomale dominante	Faux-sens	52
			Duplication génique	
			Délétion d'acide aminé	
PSEN1	14q24.3	Autosomale dominante	Faux-sens	215
			Petits indels	
			Délétion génomique	
PSEN2	1q31-q42	Autosomale dominante	Faux-sens	31

Modifié de (Cacace *et al.*, 2016). « APP » : précurseur de la protéine amyloïde; « PSEN1 » : gène de la préséniline 1, « PSEN2 » : gène de la préséniline 2.

Tableau II. Liste de quelques mutations d'APP reliées à la maladie d'Alzheimer

Nom	Mutation	Modèle de recherche	Effet	Références
	E665D	0	Non connu	(Peacock <i>et al.</i> , 1994; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Swedish	K670N/ M671L	48	Potentialisation du clivage par la β -secrétase et de la sécrétion d'A β	(Mullan <i>et al.</i> , 1992; Haass <i>et al.</i> , 1995b; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Icelandic	A673T	0	Mutation protectrice en diminuant la production de peptides A β d'environ 40% et l'A β est moins sujette à l'agrégation	(Peacock <i>et al.</i> , 1993; Van Dam & De Deyn, 2006; Jonsson <i>et al.</i> , 2012; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	A673V*	0	Potentialisation du clivage par la β -secrétase et augmentation de l'agrégation d'A β	(Di Fede <i>et al.</i> , 2009; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
English	H677R	0	Accélération de formation de fibrilles et toxicité plus grande qu'avec l'A β sauvage	(Janssen <i>et al.</i> , 2003; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Tottori	D678N	0	Accélération de formation de fibrilles et toxicité plus grande qu'avec l'A β sauvage	(Wakutani <i>et al.</i> , 2004; Van Dam & De Deyn, 2006; Hori <i>et al.</i> , 2007; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Taiwanese	D678H	0	Augmentation de la sécrétion d'A β , du ratio A β 42/A β 40 et altération des propriétés d'assemblage d'A β -zinc/cuivre	(Hori <i>et al.</i> , 2007; Chen <i>et al.</i> , 2012b; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Leuven	E682K	0	Potentialisation du clivage par la β -secrétase causant une augmentation significative d'A β totale et des niveaux de ratio A β 42/A β 40	(Zhou <i>et al.</i> , 2011; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	K687N	0	Réduction du clivage d'APP par l' α -secrétase. Réduction de la production de sAPP α . Augmentation des niveaux d'A β .	(Kaden <i>et al.</i> , 2012; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Flemish	A692G	0	Inhibition de l' α -secrétase et augmentation de la sécrétion d'A β 42	(Hendriks <i>et al.</i> , 1992; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	E693 Δ	1	A β mutante plus résistante à la dégradation par la neprilysine et l'IDE ainsi que plus grande inhibition de la LTP que l'A β sauvage	(Tomiyama <i>et al.</i> , 2008; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)

Nom	Mutation	Modèle de recherche	Effet	Références
Dutch	E693Q	4	Accélération de la formation de protofibrilles	(Walsh <i>et al.</i> , 1997; Nilsberth <i>et al.</i> , 2001; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016)
Artic	E693G	3	Augmentation de la formation de protofibrilles d'Aβ et diminution de la dégradation d'Aβ par la neprilysine	(Kamino <i>et al.</i> , 1992; Nilsberth <i>et al.</i> , 2001; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Italian	E693K	0	Production de feuilletts bêta antiparallèles plus toxiques que les feuilletts bêta parallèles produits par la forme sauvage	(Irie <i>et al.</i> , 2005; Van Dam & De Deyn, 2006; Bugiani <i>et al.</i> , 2010; Hubin <i>et al.</i> , 2015; Cacace <i>et al.</i> , 2016)
Iowa	D694N	2	Augmentation de la formation de fibrilles et plus grande toxicité induite par l'Aβ	(Grabowski <i>et al.</i> , 2001; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Piedmont	L705V	0	Formation de protofibrilles plus rapide et toxicité d'Aβ plus élevée que la forme sauvage	(Obici <i>et al.</i> , 2005; Van Dam & De Deyn, 2006; Fossati <i>et al.</i> , 2010; Cacace <i>et al.</i> , 2016)
	A713T	0	Non connu	(Carter <i>et al.</i> , 1992; Armstrong <i>et al.</i> , 2004; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Iranian	T714A	0	Non connu	(Pasalar <i>et al.</i> , 2002; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Austrian	T714I	1	Augmentation du ratio Aβ42/Aβ40 (de près de 11 fois)	(Kumar-Singh <i>et al.</i> , 2000; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
French	V715M	0	Réduction de la production totale d'Aβ, spécialement de l'Aβ40 sans changer l'Aβ42	(Ancolio <i>et al.</i> , 1999; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
German	V715A	0	Augmentation du ratio Aβ42/Aβ40	(Cruts <i>et al.</i> , 2003; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Florida	I716V	1	Altération du site de clivage par la γ-sécrétase, augmentation du ratio Aβ42(43)/Aβ40	(Eckman <i>et al.</i> , 1997; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Iberian	I716F	2	Altération du site de clivage par la γ-sécrétase, augmentation du ratio Aβ42/Aβ40	(Van Dam & De Deyn, 2006; Guerreiro <i>et al.</i> , 2010; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	I716T	0	Non connu	(Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	I716M**	0	Non connu	(Blauwendraat <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)

Nom	Mutation	Modèle de recherche	Effet	Références
London	V717I	12	Altération du site de clivage par la γ -secrétase, augmentation du ratio A β 42/A β 40	(Goate <i>et al.</i> , 1991; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	V717L	0	Augmentation du ratio A β 42/A β 40	(Murrell <i>et al.</i> , 2000; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Indiana	V717F	10	Augmentation du ratio A β 42/A β 40	(Murrell <i>et al.</i> , 1991; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	V717G	0	Augmentation du ratio A β 42/A β 40	(Chartier-Harlin <i>et al.</i> , 1991; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	T719P	0	Réduction de l'A β totale dans le CSF et déséquilibre des proportions de peptides A β	(Ghidoni <i>et al.</i> , 2009; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
	M722K	0	Augmentation d'A β 42, mais pas d'A β 40 et augmentation du ratio A β 42/A β 40 (1.7 fois) ainsi qu'augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau	(Wang <i>et al.</i> , 2015a; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Australian	L723P	0	Augmentation d'A β 42	(Kwok <i>et al.</i> , 2000; Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Belgian	K724N	0	Augmentation du ratio A β 42/A β 40	(Theuns <i>et al.</i> , 2006; Cacace <i>et al.</i> , 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016)
Chinese	K724M	0	Augmentation du ratio A β 42/A β 40	(Peng <i>et al.</i> , 2014; Cacace <i>et al.</i> , 2016)

* mutation récessive; ** mutation à prédiction pathogénique *in silico*; Δ délétion. Modifié de (Van Dam & De Deyn, 2006; Cacace *et al.*, 2016; Alzforum, consulté le 22 juin 2016). « α -secrétase» : alpha-secrétase; « β -secrétase» : bêta-secrétase; « γ -secrétase» : gamma-secrétase; «A β » : bêta-amyloïde; «APP» : précurseur de la protéine amyloïde; «CSF» : de l'anglais *Cerebrospinal fluid*; «IDE» : de l'anglais *Insulin degrading enzyme*; «LTP» : de l'anglais *Long-term potentiation*; «sAPP α » : APP soluble alpha; Acides aminés «A» : Alanine; «D» : Acide aspartique; «E» : Acide glutamique; «F» : Phénylalanine; «G» : Glycine; «H» : Histidine; «I» : Isoleucine; «K» : Lysine; «L» : Leucine; «M» : Méthionine; «N» : Asparagine; «P» : Proline; «Q» : Glutamine; «R» : Arginine; «T» : Thréonine.

APP (précurseur de la protéine amyloïde) et la cascade amyloïde, cause potentielle de la maladie d'Alzheimer ?

En raison des mutations menant à la maladie d'Alzheimer, l'A β ainsi que sa protéine précurseur, APP, ont rapidement été au centre de la recherche. En effet, la base de l'hypothèse de la cascade amyloïde vient du fait que toutes les mutations causant les FAD mènent à un déséquilibre de la production d'A β (Hardy & Selkoe, 2002). Dans le même ordre d'idée, l'hérédité d'une mutation faux-sens dans l'APP causant la diminution de la production d'A β , et donc également de son agrégation, protège contre la maladie d'Alzheimer et d'autres déclin cognitifs dépendant de l'âge (Tableau II : Icelandic) (Jonsson *et al.*, 2012; Selkoe & Hardy, 2016).

Le précurseur de la protéine amyloïde (APP)

Une protéine sur le chromosome 21 a été identifiée comme la source d'A β et nommée précurseur de la protéine amyloïde (*Amyloid precursor protein* – « APP ») (Glenner & Wong, 1984; Chami *et al.*, 2016). L'APP est exprimé dans toutes les cellules des mammifères et montre une haute conservation évolutive (Nilsson, 2006b). Cette protéine appartient à une petite famille qui inclut les protéines *APP-like 1* et *APP-like 2* (« APLP1 » et « APLP2 » respectivement). L'APP est une protéine transmembranaire de type 1 avec une petite portion intracellulaire et une large région extracellulaire (van der Kant & Goldstein, 2015) qui existe en au moins 3 isoformes apparaissant suite à différents épissages alternatifs. L'isoforme APP770 contient un domaine KPI (de l'anglais *Kunitz-type protease inhibitor*) ainsi qu'un domaine OX-2 (de l'anglais *OX-2 antigen of thymus-derived lymphoid cells*). L'isoforme APP751 ne contient que le domaine KPI. Le troisième isoforme, APP695, ne contient aucun de ces deux domaines et est l'isoforme prédominant dans le cerveau (Belyaev *et al.*, 2010). L'APP695 a été cloné pour la première fois en 1987, et, depuis, des études démontrent qu'une dérégulation du clivage de l'APP contribue à la pathologie de la maladie d'Alzheimer (Kang *et al.*, 1987; Chami *et al.*, 2016). En effet, il existe deux principaux types de clivage (a) le clivage non amyloïdogénique et (b) le clivage amyloïdogénique. Dans le clivage non

amyloïdogénique, l'APP est séquentiellement clivé par l'action de l'alpha-sécrétase (« α -sécrétase ») puis de la gamma-sécrétase (« γ -sécrétase ») et ne libère pas d'A β . Par contre, comme son nom l'indique, le clivage amyloïdogénique produit de l'A β en passant séquentiellement par l'action de la bêta-sécrétase (« β -sécrétase ») puis, également, par la γ -sécrétase (Figure 1).

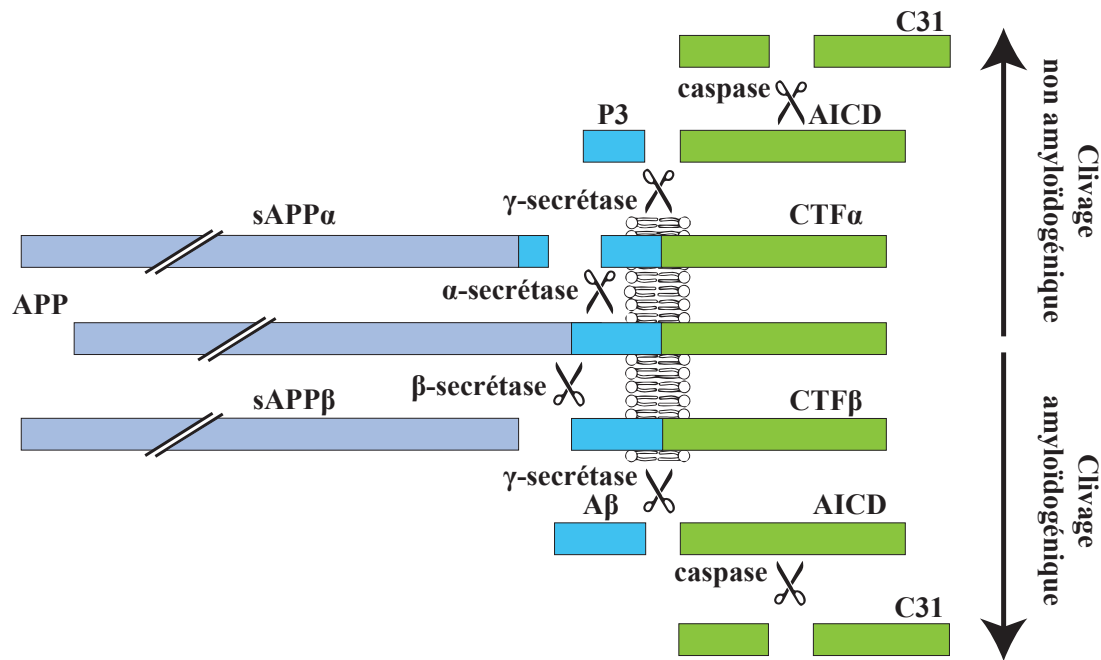


Figure 1. Clivage de l'APP

Clivage amyloïdogénique et non amyloïdogénique ainsi que les produits de clivage; Image produite par Sara Licea; « α -sécrétase » : alpha-sécrétase; « β -sécrétase » : bêta-sécrétase; « γ -sécrétase » : gamma-sécrétase; « A β » : bêta-amyloïde ; « AICD » : de l'anglais *APP intracellular domain*; « APP » : précurseur de la protéine amyloïde; « CTF α » : de l'anglais *C-terminal fragment alpha*; « CTF β » : de l'anglais *C-terminal fragment beta*; « sAPP α » : APP soluble alpha; « sAPP β » : APP soluble beta.

La fonction biologique de l'APP n'est pas encore bien établie. L'APP est une source riche en peptides, puisqu'il peut être clivé de diverses façons produisant au moins cinq fragments (Figure 1). En effet, l'APP peut produire deux différentes séquences solubles extracellulaires suite au clivage de l' α - ou de la β -sécrétase nommées APP soluble alpha (« sAPP α ») et APP soluble bêta (« sAPP β ») respectivement. Le clivage par l' α -sécrétase et la

β -secrétase génère aussi les fragments CTF α et CTF β (de l'anglais *C-terminal fragment α/β*) respectivement. Ensuite, le clivage par la γ -secrétase de CTF α et CTF β produit P3 ainsi qu'A β respectivement tout en libérant dans les deux cas le domaine intracellulaire de l'APP (*APP intracellular domain* – « AICD »).

Clivage non amyloïdogénique par l'alpha-secrétase

Le clivage de l'APP par la voie non amyloïdogénique serait prédominant dans tous les types cellulaires à l'exception peut-être des neurones (Haass *et al.*, 2012). Ce clivage est catalysé par l' α -secrétase (Figure 1) et se produit à la surface cellulaire (Esch *et al.*, 1990; Sisodia, 1992; Haass *et al.*, 2012). Plusieurs enzymes candidates ont été identifiées comme étant l' α -secrétase dont: ADAM9 (de l'anglais *A disintegrin and metalloprotease domain 9*), ADAM10, MDC9 (de l'anglais *Metalloprotease/disintegrin/cystein-rich protein 9*) et ADAM17/TACE (de l'anglais *Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme*) (Allinson *et al.*, 2003; Thinakaran & Koo, 2008). L' α -secrétase clive l'APP entre la Lys16 et la Leu17 directement dans le domaine A β pour générer et sécréter un fragment soluble sAPP α et un fragment C83, aussi appelé CTF α , qui sera clivé par la γ -secrétase (Sisodia, 1992; Haass *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 2012).

La famille des protéines ADAM serait impliquée dans la régulation des contacts de cellule à cellule ou de cellule à matrice extracellulaire ainsi que dans la dégradation de matrices extracellulaires (Jacobsen, 2010). De plus, plusieurs protéines sont libérées et sécrétées suite à la protéolyse faite par les ADAM comme des cytokines, des facteurs de croissance et leurs récepteurs et des protéines d'adhésion cellulaire. En effet, toutes ces protéines sont initialement synthétisées comme protéines ancrées à la membrane devant être clivées pour être activées (Jacobsen, 2010).

Clivage amyloïdogénique par la bêta-secrétase

La majorité de l'activité de la β -secrétase provient de la BACE1 (de l'anglais *Beta-site APP cleaving enzyme 1*) (Vassar *et al.*, 1999). La BACE1 clive l'APP à deux sites bêta :

l'acide Asp+1 et Glu+11 du domaine A β pour générer un fragment C99 et C89 respectivement, aussi nommés CTF β (Vassar *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006). Puisque la BACE1 est une protéase aspartique, le pH optimum de son activité enzymatique est d'environ pH4.5 (Haass *et al.*, 1992; Vassar *et al.*, 1999). Ceci est cohérent avec le fait que la majorité de l'activité de la β -sécrétase se trouve dans les endosomes (Golde *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 2012). La BACE1 a un motif d'expression bien précis, c'est-à-dire qu'elle est plus fortement exprimée dans les neurones et le pancréas. Ceci pourrait expliquer pourquoi les neurones sont particulièrement vulnérables dans la maladie d'Alzheimer alors que l'APP est exprimé ubiquitairement (Vassar *et al.*, 1999; Lichtenthaler *et al.*, 2011). De plus, il semble que la BACE1 peut être détectée dans les neurones de toutes les régions, mais très peu dans les cellules gliales (Vassar *et al.*, 1999). Il n'y a pas de mutation connue de BACE1 dans sa séquence génique associée à la maladie d'Alzheimer. Cependant, son expression et son activité sont élevées dans les cerveaux Alzheimer (Fukumoto *et al.*, 2002; Holsinger *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004b).

Il existe également un paralogue, la BACE2, dont l'expression neuronale est basse, voire indétectable (Bennett *et al.*, 2000a). De plus, la BACE2 peut cliver l'APP au site α (entre Lys16 et Leu17), empêchant essentiellement la génération d'A β intacte (Thinakaran & Koo, 2008). Le gène de la BACE1 se trouve sur le chromosome 11 et encode une protéine de 501 acides aminés alors que le gène de la BACE2 se trouve sur le même chromosome que l'APP, le chromosome 21, et encode une protéine de 518 acides aminés (Webb & Murphy, 2012). La BACE1 et la BACE2 possèdent un degré d'homologie de 75%, bien que les deux enzymes ne semblent pas avoir les mêmes fonctions (Sun *et al.*, 2006b).

En plus de l'APP, plusieurs autres substrats de BACE1 ont été identifiés comme la neur  guline-1 (Willem *et al.*, 2006), le SELPG-1 (de l'anglais *Selectin P ligand 1*) (Lichtenthaler *et al.*, 2011), l'APLP1/APLP2 (Li & S  dhof, 2004a), la sous-unité b des canaux sodiques voltage-dépendant (Wong *et al.*, 2005), le récepteur-2 de l'interleukine-1 (Kuhn *et al.*, 2007) et la LPR (de l'anglais *low-density lipoprotein receptor-related*) (von Arnim *et al.*, 2005).

La gamma-sécrétase participe aux deux types de clivage

La γ -sécrétase clive le domaine transmembranaire de l'APP à plusieurs sites, générant ainsi plusieurs tailles de peptides. Dans la voie amyloïdogénique, la γ -sécrétase clive le fragment C99 pour libérer des peptides A β variant de 34 à 50 acides aminés (Kummer & Heneka, 2014; van der Kant & Goldstein, 2015). Dans le cas de la voie non amyloïdogénique, la γ -sécrétase clive le fragment C83 pour générer un fragment P3 (Gowing *et al.*, 1994; Lalowski *et al.*, 1996; Thinakaran & Koo, 2008). Quelle que soit la voie de clivage, le fragment AICD est toujours libéré par la γ -sécrétase (Figure 1). Bien que l'emplacement de l'activité de la γ -sécrétase n'est pas complètement élucidé, les données semblent suggérer que la γ -sécrétase mature et active est localisée à la fois à la membrane plasmique et dans les systèmes d'endosomes/lysosomes (Kaether *et al.*, 2006; Dries & Yu, 2008; Haass *et al.*, 2012).

Le complexe de la γ -sécrétase n'est pas complètement caractérisé. Cependant, des partenaires sont connus incluant la PS (préséniline) 1 et 2, la Nct (nicastrine), l'APH-1 (de l'anglais *Anterior pharynx defective-1*) et le PEN-2 (de l'anglais *Presenilin enhancer 2*) (De Strooper, 2003). La PS contiendrait le domaine catalytique du complexe, plus précisément deux aspartates localisées dans ses domaines transmembranaires (Wolfe *et al.*, 1999). Lors de l'assemblage du complexe de la γ -sécrétase, la PS subit une autoprotéolyse dans sa large boucle intracellulaire connectant les deux domaines transmembranaires qui contiennent chacune une aspartate conservée (Wolfe, 2013). Cette protéolyse forme deux fragments, NTF-PS (de l'anglais *N-terminal fragment*) et CTF-PS, conférant l'activité de la γ -sécrétase (Wolfe *et al.*, 1999).

Le gène de la PS1 se trouve sur le chromosome 14 alors que celui de la PS2 sur le chromosome 1 (Schellenberg *et al.*, 1992; Van Broeckhoven *et al.*, 1992; Levy-Lahad *et al.*, 1995a; Levy-Lahad *et al.*, 1995b; Khanahmadi *et al.*, 2015). Toutes deux semblent être exprimées de façon ubiquitaire comme l'APP, mais de façon plus élevée dans les neurones ainsi que dans les cerveaux en développement (Lee *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2013). La PS1 et la PS2 montrent également un haut degré d'homologie (Hardy, 1997).

Plusieurs données impliquant la PS dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer ont fait rapidement surface indiquant son importance. Tout d'abord, le plasma d'individus avec

des mutations de la PS contient plus d'A β 42 (Scheuner *et al.*, 1996; Hardy, 1997). Par ailleurs, leurs cerveaux avaient une abondance de dépôts amyloïdes (Lemere *et al.*, 1996b; Hardy, 1997). De plus, les fibroblastes d'individus avec des mutations sur PS (Scheuner *et al.*, 1996; Hardy, 1997), les animaux transgéniques surexprimant une forme mutante (et non pas la forme sauvage) de la PS (Borchelt *et al.*, 1996; Duff *et al.*, 1996; Hardy, 1997) et les cellules transfectées avec une forme mutante de PS produisent plus d'A β 42 (Borchelt *et al.*, 1996; Hardy, 1997).

La γ -secrétase possède plusieurs autres substrats, dont les protéines APLP1/APLP2 (Walsh *et al.*, 2003), Notch1-4 (Mumm & Kopan, 2000), N-cadherin (Marambaud *et al.*, 2003; Kopan & Ilagan, 2004), E-cadherin (Marambaud *et al.*, 2002), CD44 (Okamoto *et al.*, 2001; Kopan & Ilagan, 2004) et p75 (Jung *et al.*, 2003; Kopan & Ilagan, 2004).

Autres clivages de l'APP (précurseur de la protéine amyloïde)

Des études montrant que la demi-vie de l'APP est très courte et que l'APP n'est pas entièrement sécrété en sAPP suggèrent l'existence de voies de clivage indépendantes des secrétases (Haass *et al.*, 2012). En effet, il semble que le protéasome puisse cliver l'APP à plusieurs sites (Nunan *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que l'APP peut également être dégradé par des lysosomes en fragments non amyloïdogéniques et amyloïdogéniques (Golde *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 2012). L'autophagie est une voie de dégradation cellulaire importante conservée dans les eucaryotes pour soulager divers stress cellulaires (Huang & Klionsky, 2007). La démonstration que les vacuoles autophagiques contiennent des APP, des CTF β et des BACE1 en plus d'être parmi les compartiments cellulaires les plus riches en γ -secrétase indique que ces vacuoles sont potentiellement des sites actifs de production d'A β (Yu *et al.*, 2004). Il y a une accumulation anormale de ces vacuoles autophagiques dans les neurones de cerveaux Alzheimer suggérant leur rôle dans la pathologie (Yu *et al.*, 2004). Finalement, l'APP semble également être un substrat des caspases et certaines études suggèrent que ce clivage pourrait favoriser l'amyloïdogénèse (Barnes *et al.*, 1998; Gervais *et al.*, 1999; LeBlanc *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000; Galvan *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Tesco *et al.*, 2003; Haass *et al.*, 2012).

Fonctions des produits de clivage

Plusieurs rôles putatifs ont été attribués à l'APP, principalement dans le cerveau en développement. En effet, les plantes, les procaryotes et les levures ne semblent pas être dotés de membres de la famille de protéines APP et l'apparition de cette famille de protéines coïncide avec l'évolution de systèmes nerveux avec synapses fonctionnelles (Shariati & De Strooper, 2013). De plus, l'expression de l'APP chez les souris et les rats peut être détectée très tôt dans l'embryogenèse indiquant un rôle probable dans le développement (Sarasa *et al.*, 2000; Ott & Bullock, 2001; van der Kant & Goldstein, 2015). Des études suggèrent que l'APP influence la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la pousse neuritique, l'adhésion cellulaire et la synaptogénèse (Dawkins & Small, 2014). Par exemple, lorsque les niveaux d'APP dans le cortex sont réduits, la migration des cellules précurseurs neuronales (*neuronal precursor cells*) est perturbée (Young-Pearse *et al.*, 2007; van der Kant & Goldstein, 2015). De plus, ces défauts de migration sont rétablis par la surexpression d'APP humain (APP695 et APP751) et même d'APP mutant (Swedish et Indiana), mais non par l'APP tronqué (van der Kant & Goldstein, 2015). En effet, les délétions de portions d'APP suggèrent que les fragments N-terminaux et les fragments C-terminaux sont nécessaires pour le rétablissement total de la migration normale (Young-Pearse *et al.*, 2007). L'APP est exprimé dans les sites pré et post-synaptiques et son expression augmente fortement pendant la période critique de synaptogénèse (Clarris *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2009; Dawkins & Small, 2014). De plus, Dawson et collègues (Dawson *et al.*, 1999) observèrent que les souris dépourvues d'APP (*APP knockout* – « APP -/- ») ont des problèmes de réponses de LTP. Ces souris ont également une masse cérébrale plus petite (Magara *et al.*, 1999) et une quantité de synapses inférieure (Tyan *et al.*, 2012) aux souris témoins.

Cependant, les expériences avec les souris APP -/- ne déterminent pas si c'est l'holoprotéine APP ou ses produits de clivage qui sont la cause des effets observés. Par contre, des expériences avec l'application de sAPP α et sAPP β suggèrent que ces produits solubles sont responsables d'une partie des effets sur la croissance cellulaire, la formation synaptique et la pousse neuritique (van der Kant & Goldstein, 2015). Ces deux fragments solubles peuvent

entre autres interagir avec le récepteur neurotrophine p75 pour favoriser la pousse neuritique (Hasebe *et al.*, 2013). De plus, il semblerait que l'infusion de sAPP α après des blessures traumatiques au cerveau puisse améliorer la survie neuronale et le rétablissement (Thornton *et al.*, 2006). sAPP α est considéré un neuroprotecteur alors que sAPP β est considéré un neuroprotecteur moins puissant, voire même un produit nocif pour les neurones (van der Kant & Goldstein, 2015). Le peptide P3 quant à lui a généralement été pensé sans rôle particulier et non amyloïdogénique. Cependant, celui-ci se retrouve dans les dépôts préamyloïdes chez des patients atteints de la Trisomie 21 (patients surexprimant l'APP) (Lalowski *et al.*, 1996) ainsi que dans des larges dépôts diffus d'amyloïdes dans des cerveaux de patients Alzheimer (Gowing *et al.*, 1994). Plus récemment, des effets neurotoxiques lui ont été attribués (Wei *et al.*, 2002).

Fonctions du domaine intracellulaire de l'APP (*APP intracellular domain* – « AICD »)

L'AICD semble avoir plusieurs rôles de par ses multiples domaines et sites de phosphorylation (Suzuki & Nakaya, 2008). Ainsi, l'AICD aurait un rôle en tant que domaine fonctionnel faisant partie de l'holoprotéine APP, mais aussi en tant que peptide une fois clivé et libéré dans le cytoplasme par la γ -secrétase. Entre autres, l'AICD libre pourrait être transloqué au noyau où il aurait une fonction de facteur de transcription en raison de son interaction avec la protéine Fe65 et Tip60 (Pardossi-Piquard & Checler, 2012).

L'APP interagit avec plusieurs protéines qui ont un domaine de liaison phosphotyrosine (Fe65, X11, Dab-1, JIP-1) ou un domaine SH2 (de l'anglais *Src homology 2*) (van der Kant & Goldstein, 2015). Ces protéines lient l'APP de façon phospho-dépendante. L'AICD contient huit potentiels sites de phosphorylation, mais seulement sept seraient phosphorylés (Lee *et al.*, 2003; van der Kant & Goldstein, 2015) (Figure 2). De ces sites, la Thr668 est certainement la plus étudiée et plusieurs rôles lui ont été attribués. La Thr668 est située dans le motif : ⁶⁶⁷VTPEER⁶⁷² (Suzuki & Nakaya, 2008). Sa phosphorylation induit un changement conformationnel (isomérisation) de la région cytoplasmique affectant l'interaction de l'AICD avec d'autres protéines (Ando *et al.*, 2001; Suzuki & Nakaya, 2008). De plus, la phosphorylation de la Thr668 rendrait l'APP moins vulnérable au clivage par les caspases

(Taru *et al.*, 2004; Suzuki & Nakaya, 2008). Finalement, cette phosphorylation favoriserait l'association entre l'APP et la BACE1 renforçant le clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique (Lee *et al.*, 2003).

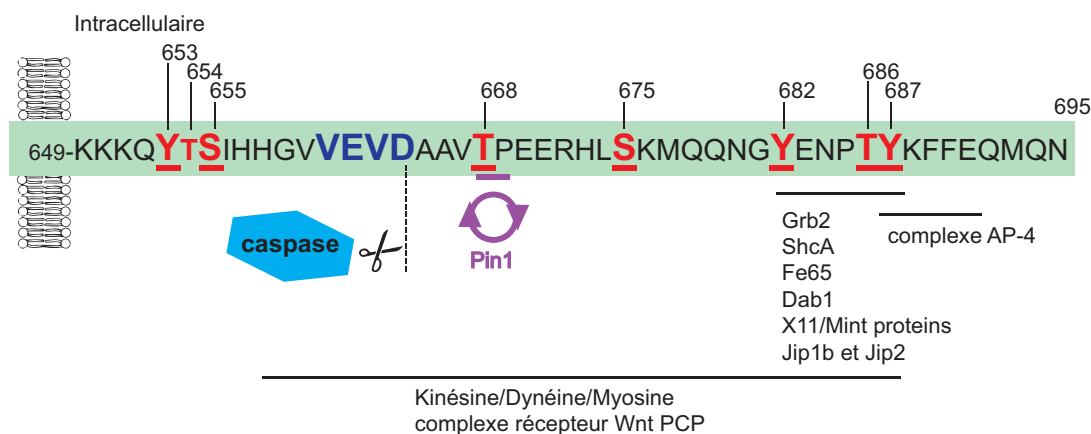


Figure 2. Domaine intracellulaire de l'APP (*APP intracellular domain* – « AICD »)

Séquence des acides aminés de l'AICD. En rouge, les huit sites potentiels de phosphorylation et soulignés en rouge, les sept sites qui ont été identifiés comme étant phosphorylables (Lee *et al.*, 2003). En bleu, la séquence de reconnaissance par les caspases VEVD. En mauve, le site d'isomérisation influencé par la phosphorylation de la Thr668 ainsi que la liaison avec Pin1 (van der Kant & Goldstein, 2015). Liste de quelques protéines se liant de façon phospho-dépendante à l'AICD (van der Kant & Goldstein, 2015); Image produite par Sara Licea modifiée de (Suzuki & Nakaya, 2008; van der Kant & Goldstein, 2015); « AP-4 » : de l'anglais *Adaptator related protein complex 4*, « DAB1 » : de l'anglais *Dab reelin signal transducer 1*, « Fe65 » : aussi connu sous le nom de APBB1 – de l'anglais *Amyloid beta precursor protein binding family B member 1*, « Grb2 » : de l'anglais *Growth factor receptor-bound protein 2*, « Jip1b » : de l'anglais *JNK-interacting protein 1b*, « Jip2 » : de l'anglais *JNK-interacting protein 2*, « Mint » : de l'anglais *Munc18-interacting proteins*, « Pin1 » : *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*, « ShcA » : de l'anglais *Src homology domain-containing transforming protein 1*, « X11 » : aussi connu sous le nom de APBA1 – *Amyloid beta precursor protein binding family A member 1*

L'AICD possède également un motif typique de triage et un motif typique d'internalisation de protéines membranaires : $^{653}\text{YTSI}^{656}$ et $^{681}\text{GYENPTY}^{687}$ respectivement (Chen *et al.*, 1990; Nordstedt *et al.*, 1993; Perez *et al.*, 1999; Suzuki & Nakaya, 2008). La

phosphorylation des tyrosines dans ces deux motifs semble affecter la localisation cellulaire de l'APP et donc potentiellement sa voie de clivage (Rebelo *et al.*, 2007; Suzuki & Nakaya, 2008; Thinakaran & Koo, 2008). La majorité des protéines qui interagissent avec l'AICD le font à travers leur liaison avec le domaine ⁶⁸¹GYENPTY⁶⁸⁷. L'état de phosphorylation de la Tyr682 et de la Tyr687 influence l'interaction entre ce domaine et les protéines (Perez *et al.*, 1999; e Silva & e Silva, 2003). C'est cependant la phosphorylation de la Thr668 qui induit un changement conformationnel qui affecterait plus fortement la liaison des protéines avec la région ⁶⁸¹GYENPTY⁶⁸⁷ (Ando *et al.*, 2001; Suzuki & Nakaya, 2008). Certains acides aminés phosphorylés ont été trouvés en plus grandes quantités dans les cerveaux Alzheimer, c'est pourquoi l'étude de leur état de phosphorylation et leurs fonctions est importante à élucider. Les phosphorylations de la Tyr653, la Ser655, la Thr668, la Ser675, la Tyr682, la Thr686 et la Tyr687 seraient liées à la maladie d'Alzheimer, mais beaucoup de résultats se contredisent en raison de la difficulté à détecter les phosphorylations d'APP de façon *post mortem* (Jacobsen & Iverfeldt, 2009; Schettini *et al.*, 2010). De plus, ces résultats ne nous indiquent pas si les phosphorylations sont une cause de certaines voies menant au développement de la maladie d'Alzheimer ou une conséquence de l'activation de ces voies.

L'Aβ (bêta-amyloïde) et son agrégation en plaque amyloïde

Le clivage par la γ-sécrétase peut générer un peptide Aβ variant de 34 à 50 acides aminés (Kummer & Heneka, 2014). Les deux peptides d'Aβ monomère les plus étudiés sont les peptides Aβ40 (court) et Aβ42 (long) contenant 40 et 42 acides aminés respectivement. L'Aβ40 représenterait près de 90% de tous les fragments générés, mais c'est le peptide Aβ42 qui forme aisément des fibrilles et qui causerait la maladie d'Alzheimer (Sisodia & St George-Hyslop, 2002). En effet, l'Aβ42 se trouve dans les dépôts avant l'Aβ40 et s'agrège plus rapidement que l'Aβ40 *in vitro* suggérant que la toxicité et l'habileté de s'agréger sont reliées (Walsh & Teplow, 2012).

Les plaques amyloïdes ne sont pas uniformes. Elles sont divisées en deux types: (a) les plaques diffuses et (b) les plaques séniles. Dans les plaques diffuses, les peptides Aβ ne sont pas en conformation de feuillets plissés bêta (*beta-pleated sheets*) typiques. C'est pourquoi ces

plaques sont également nommées « préamyloïdes » et seraient la forme précurseur des plaques séniles (Sheng *et al.*, 1997). Les plaques séniles quant à elles ont un cœur dense d'A β en conformation de feuillets plissés bêta entouré d'un halo de neurites dystrophiques (Yamaguchi *et al.*, 1989; Dickson, 1997; Nilsson, 2006b). Il existe une variété d'espèces d'A β (monomère, dimère, oligomère, etc.) qui ont été isolées du cerveau Alzheimer (Figure 3). Celles-ci induisent une toxicité et des dysfonctions synaptiques dans des cellules en culture ainsi que dans des cerveaux de rongeurs (Lesné *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2008; Eisenberg & Jucker, 2012).

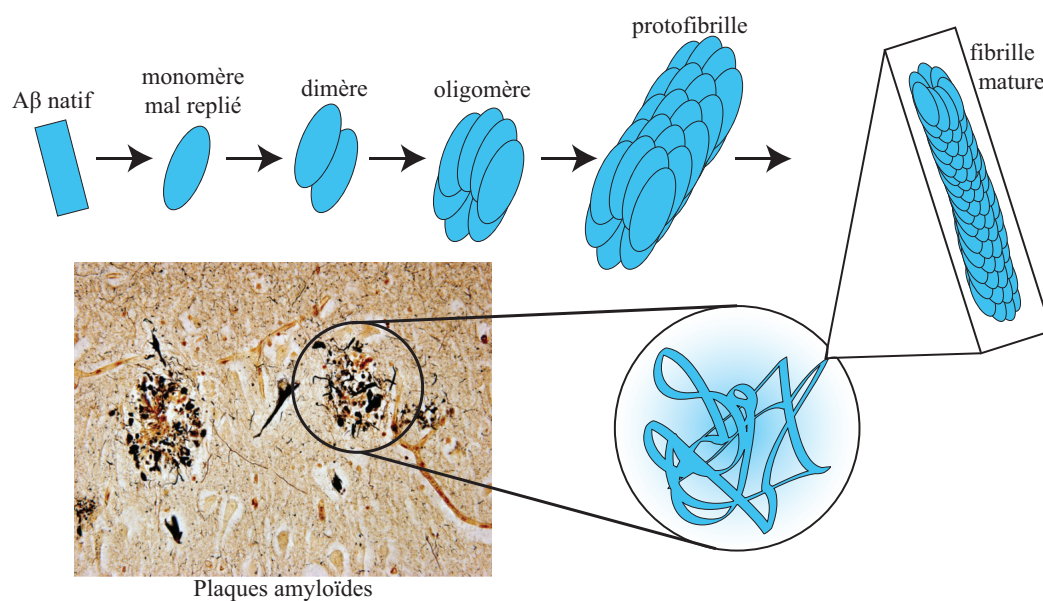


Figure 3. Agrégation de l'A β

Illustration de l'agrégation d'amyloïde. Protéines natives incorrectement repliées mènent à la formation de protofibrilles puis finalement à des fibrilles matures qui se retrouvent dans les plaques amyloïdes; Image produite par Sara Licea, Immunocoloration Bielschowsky modifiée tirée de (Perl, 2010); « A β » : bêta-amyloïde.

L'analyse d'autopsies d'individus atteints de la maladie d'Alzheimer a montré que les espèces solubles d'A β (oligomères d'A β) corrélaient plus fortement avec le degré de démence que la masse de plaques séniles (Lue *et al.*, 1999; McLean *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000; Haass & Selkoe, 2007; Eisenberg & Jucker, 2012). En effet, le rôle toxique de l'A β soluble a été montré, entre autres, sur les synapses en altérant la LTP et la

signalisation calcique intracellulaire. Ces événements mènent à une réduction de la taille des synapses et à une composition anormale du groupe de protéines à la région dense postsynaptique (*postsynaptic density region*) (Heffernan *et al.*, 1998; Lue *et al.*, 1999; Reese *et al.*, 2011; Ma & Klann, 2012b).

Il y a près de 30 ans, le rôle des dérèglements calciques dans la maladie d'Alzheimer a été postulé (Khachaturian, 1987; Green & LaFerla, 2008). C'est en raison des changements calciques attribués à la toxicité d'A β que l'hypothèse du calcium de la maladie d'Alzheimer a été formulée. Cette hypothèse explore comment l'A β vient remodeler le calcium (Ca²⁺) neuronal impliqué dans les voies responsables de la cognition (Bojarski *et al.*, 2008; Green & LaFerla, 2008; Berridge, 2010). Il semble qu'une augmentation de Ca²⁺ a également lieu suite à certaines mutations de la maladie d'Alzheimer (Guo *et al.*, 1999; Leissring *et al.*, 2000; LaFerla, 2002; Berridge, 2010) et qu'en revanche l'augmentation de Ca²⁺ puisse stimuler le métabolisme de l'APP (Querfurth & Selkoe, 1994; Berridge, 2010). Ce genre d'interactions bidirectionnelles est fréquemment observé dans la maladie d'Alzheimer puisqu'ils introduisent un élément de rétroaction positive qui pourrait être crucial pour l'apparition et la progression de la maladie d'Alzheimer (Berridge, 2010).

Souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer

Les souris modèles ont été initialement basées sur les mutations causant les FAD. Games et collègues (Games *et al.*, 1995) décrivirent le premier modèle murin transgénique de la maladie d'Alzheimer et le nommèrent PDAPP. Cette souris exprime l'APP humain avec la mutation Indiana (V717F). Elle développe des plaques composées principalement d'A β ₄₂ et celles-ci sont associées à des neurites dystrophiques, des astrocytes réactifs et des microglies activées. Cependant, cette souris n'a pas de perte neuronale dans le cortex enthorinal, la région CA1 de l'hippocampe ou encore le cortex cingulaire (Games *et al.*, 1995). D'autres modèles portant des mutations sur l'APP ont vu le jour incluant Tg2576 (Hsiao *et al.*, 1996), APP23 (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997), TgCRND8 (Chishti *et al.*, 2001) et J20 (Mucke *et al.*, 2000) (Tableau III). La souris modèle J20 est particulière puisque des déficits cognitifs sont observés dès l'âge de 1 à 2 mois (Mucke *et al.*, 2000).

Il existe beaucoup de modèles portant des mutations à la fois dans l'APP et la PS1 comme APP/PS1 (Jankowsky *et al.*, 2001), APP+PS1 (Holcomb *et al.*, 1998) et 5xFAD (Oakley *et al.*, 2006). Un défi dans la création de modèles transgéniques est de créer un outil qui se rapproche le plus de la pathologie que nous observons chez les patients. Bien qu'aucune mutation de la protéine Tau ne cause la maladie d'Alzheimer, observer la pathologie de la protéine Tau dans les modèles murins est nécessaire. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau est fréquemment observée dans les modèles murins avec mutation d'APP ou d'APP/PS1, mais les NFTs ne sont jamais observés (Selkoe & Hardy, 2016). C'est pourquoi des lignées de souris portant un transgène de la protéine Tau humaine ont été créées puisque la protéine Tau humaine, contrairement à la protéine Tau de souris, forme des NFTs (Selkoe & Hardy, 2016). Un de ces modèles est 3xTg-AD utilisant une mutation de la protéine Tau qui ne se trouve pas dans la maladie d'Alzheimer, mais bien dans la démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (*Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*) (Poorkaj *et al.*, 1998; Buée *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Oddo *et al.*, 2003).

Tableau III. Progression des déficits de mémoire chez des modèles de souris Alzheimer

Lignée	Mutation(s)	Aβ	NFTs	P syna.	Âge en mois	Y/T-M	RAWM	MWM	BW
PDAPP [A]	APP (V717F)	Oui [a]	Non [a]	Oui [b]	1-2m		[1]	[1]	
					3-5m			[2]	
					*6-8m		[3]		
					9-11m			[2]	
					12-14m			[3]	
					15-18m		[1]	[2]	
					≥19m			[3]	
Tg2576 [B]	APP (K670N/M671L)	Oui [c]	Non	Non [d]	1-2m	[5]			
					3-5m	[4]	[7]	[8]	
						[6]			
					6-8m	[7]	[7]	[7]	[9]
						[9]	[8]	[10]	
					*9-11m	[4]		[4]	
						[5]		[6]	
					12-14m			[6]	
								[10]	
15-18m	[7]	[12]	[10]	[9]					
	[11]								
≥19m	[6]		[6]						
			[10]						
APP23 [C]	APP (K670N/M671L)	Oui [e]	Non [e]	Non [f]	1-2m			[13]	
					3-5m			[13]	
					*6-8m			[13]	
					9-11m				
					12-14m				[14]
					15-18m	[16]		[16]	
					≥19m	[17]		[15]	
TgCRND8 [D]	APP (K670N/M671L, V717F)	Oui [g]	Non [g]	Non [h]	1-2m	[19]			
					*3-5m			[18]	[20]
					6-8m	[19]	[21]	[22]	
					9-11m	[19]		[23]	
					12-14m			[23]	
					15-18m				
					≥19m				
J20 [E]	APP (K670N/M671L, V717F)	Oui [i]	Non	Oui [i]	1-2m				
					3-5m		[24]	[25]	
					*6-8m		[26]	[27]	
					9-11m	[28]	[29]	[28]	
					12-14m	[30]	[26]	[31]	
					15-18m				
					≥19m		[26]		
Données non trouvées		Résultats similaires au contrôle			Résultats plus élevés par rapport au contrôle		Résultats plus faibles par rapport au contrôle		

Lignée	Mutation(s)	Aβ	NFTs	P syna.	Âge en mois	Y/T-M	RAWM	MWM	BW
APP/PS1 [F]	APP (K670N/M671L) PS1Δ9	Oui [j]	Non	Oui [i]	1-2m				
					*3-5m		[32]		
					6-8m	[35]	[37]	[36]	[34]
						[36]			
					9-11m		[38]	[33]	
					12-14m		[32]	[39]	
					15-18m			[39]	[40]
					≥19m				
APP+PS1 [G]	APP (K670N/M671L), PS1 (M146L)	Oui [k]	Non [l]	-	1-2m			[42]	
					3-5m	[41]	[43]	[8]	
						[8]			
					*6-8m		[42]	[41]	
							[8]	[42]	
					9-11m			[41]	
					12-14m				
5xFAD [H]	APP (K670N/M671L, I716V, V717I), PS1 (M146L/L286V)	Oui [m]	-	Oui [m]	15-18m	[8]	[12]	[43]	
						[43]			
					≥19m		[44]	[45]	
					*1-2m	[46]			
						[46]			
					3-5m	[48]		[47]	
						[48]			
3x-Tg-AD [I]	APP (K670N/M671L), Tau (301L) PS1 (M146L)	Oui [n]	Oui [n]	-	6-8m	[49]		[47]	
						[49]			
					9-11m	[48]		[50]	
						[48]			
					12-14m	[49]			
						[49]			
					15-18m				
Données non trouvées	Résultats similaires au contrôle	Résultats plus élevés par rapport au contrôle	Résultats plus faibles par rapport au contrôle		1-2m			[51]	
					*3-5m	[52]		[51]	
								[53]	
					6-8m	[55]		[54]	
					9-11m	[52]		[56]	
					12-14m	[52]		[53]	[57]
					15-18m			[56]	
					≥19m				

Plaques Aβ (Aβ); Enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs); Labyrinthe en Y/T (Y/T-maze – « Y/T-M »); Labyrinthe aquatique à bras radial (*Radial arm water maze* – « RAWM »); Labyrinthe aquatique de Moris (*Moris water maze* – « MWM »); Labyrinthe de Barnes (*Barnes maze* – « BW »). Les astérisques (« * ») dans la colonne d'âge représentent le moment où les plaques amyloïdes diffuses sont observables dans le cerveau de la lignée de souris en question; les traits d'union (« - ») représentent des données non trouvées; les lettres et numéros correspondent aux références suivantes : [A] (Games *et al.*, 1995), [B] (Hsiao *et al.*, 1996), [C] (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997), [D] (Chishti *et al.*, 2001), [E] (Mucke *et al.*, 2000), [F] (Jankowsky *et al.*, 2001), [G] (Holcomb *et al.*, 1998), [H] (Oakley *et al.*, 2006), [I] (Oddo *et al.*, 2003); [a] (Games *et al.*, 1995), [b] (Masliah *et al.*, 2001), [c] (Hsiao *et al.*, 1996), [d] (Lanz *et al.*, 2003), [e] (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997), [f] (Boncristiano *et al.*, 2005), [g] (Chishti *et al.*, 2001), [h] (Adalbert *et al.*, 2009), [i] (Hong *et al.*, 2016), [j] (Jankowsky *et al.*, 2004), [k] (Holcomb *et al.*, 1998), [l] (Kurt *et al.*, 2003), [m] (Oakley *et al.*, 2006), [n] (Oddo *et*

et al., 2003); [1] (Nilsson *et al.*, 2004), [2] (Hartman *et al.*, 2005), [3] (Chen *et al.*, 2000), [4] (Hsiao *et al.*, 1996), [5] (Chapman *et al.*, 1999), [6] (King *et al.*, 1999), [7] (Arendash *et al.*, 2001a), [8] (Arendash *et al.*, 2004), [9] (Ohno *et al.*, 2004), [10] (Westerman *et al.*, 2002), [11] (Corcoran *et al.*, 2002), [12] (Morgan *et al.*, 2000), [13] (Van Dam *et al.*, 2003), [14] (Prut *et al.*, 2007), [15] (Kelly *et al.*, 2003), [16] (Lalonde *et al.*, 2002), [17] (Dumont *et al.*, 2004), [18] (Chishti *et al.*, 2001), [19] (Hyde *et al.*, 2005), [20] (Görtz *et al.*, 2008), [21] (Lovasic *et al.*, 2005), [22] (Janus & Westaway, 2001), [23] (Hanna *et al.*, 2009), [24] (Lustbader *et al.*, 2004), [25] (Cheng *et al.*, 2007), [26] (Du *et al.*, 2011), [27] (Palop *et al.*, 2003), [28] (Murakami *et al.*, 2011), [29] (Fang *et al.*, 2012), [30] (Karl *et al.*, 2012), [31] (Galvan *et al.*, 2006), [32] (Park *et al.*, 2006), [33] (Cramer *et al.*, 2012), [34] (Reiserer *et al.*, 2007), [35] (Cao *et al.*, 2007), [36] (Lalonde *et al.*, 2004), [37] (Volianskis *et al.*, 2010), [38] (Sood *et al.*, 2007), [39] (Lalonde *et al.*, 2005), [40] (O’Leary & Brown, 2009), [41] (Holcomb *et al.*, 1999), [42] (Holcomb *et al.*, 1999), [43] (Arendash *et al.*, 2001b), [44] (Wilcock *et al.*, 2004), [45] (Sadowski *et al.*, 2004), [46] (Oakley *et al.*, 2006), [47] (Ohno *et al.*, 2006), [48] (Shukla *et al.*, 2013), [49] (Shukla *et al.*, 2013), [50] (Urano & Tohda, 2010), [51] (Clinton *et al.*, 2007), [52] (Carroll *et al.*, 2007), [53] (Gimenez-Llort *et al.*, 2007), [54] (Billings *et al.*, 2005), [55] (Nelson *et al.*, 2007), [56] (Pietropaolo *et al.*, 2008), [57] (Stewart *et al.*, 2011). Tableau basé sur les articles de synthèse suivants : (Webster *et al.*, 2014); (Schaeffer *et al.*, 2011); (Alzforum, consulté le 5 août 2016)

Hypothèse de la cascade amyloïde

Puisque les cas de FAD favorisent une surproduction d'A β , l'idée selon laquelle l'accumulation d'A β engendre la maladie d'Alzheimer a été mise de l'avant par Glenner et Wong (Glenner & Wong, 1984). Pendant plusieurs années, cette idée a été accueillie avec un certain scepticisme (Selkoe & Hardy, 2016) puisque l'existence de deux lésions pathologiques principales distinctes (plaques amyloïdes et NFTs) dans les cerveaux Alzheimer rend la tâche difficile à savoir laquelle est responsable du déclenchement de la maladie.

L'hypothèse de la cascade amyloïde propose que, chez les individus normaux, l'A β soit activement métabolisée, alors que chez les individus avec la maladie d'Alzheimer une augmentation de la production d'A β ainsi qu'une perturbation de son élimination sont observées. Ce déséquilibre entre la production et l'élimination des espèces toxiques causerait le développement de la maladie d'Alzheimer (Hardy & Selkoe, 2002) et les dépôts d'A β ₄₂ dans le cerveau deviendraient alors observables (Selkoe, 1991; Hardy & Higgins, 1992). Cette production et accumulation auraient pour conséquence l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, l'augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive oxygen species* – « ROS »), des dysfonctionnements mitochondriaux et l'activation de processus inflammatoires. Tout cela mènerait à la neurodégénération qui s'observe par des défauts synaptiques et la mort neuronale. Ceci se manifeste cliniquement en troubles cognitifs et pertes de mémoire (Newington, 2013) (Figure 4).

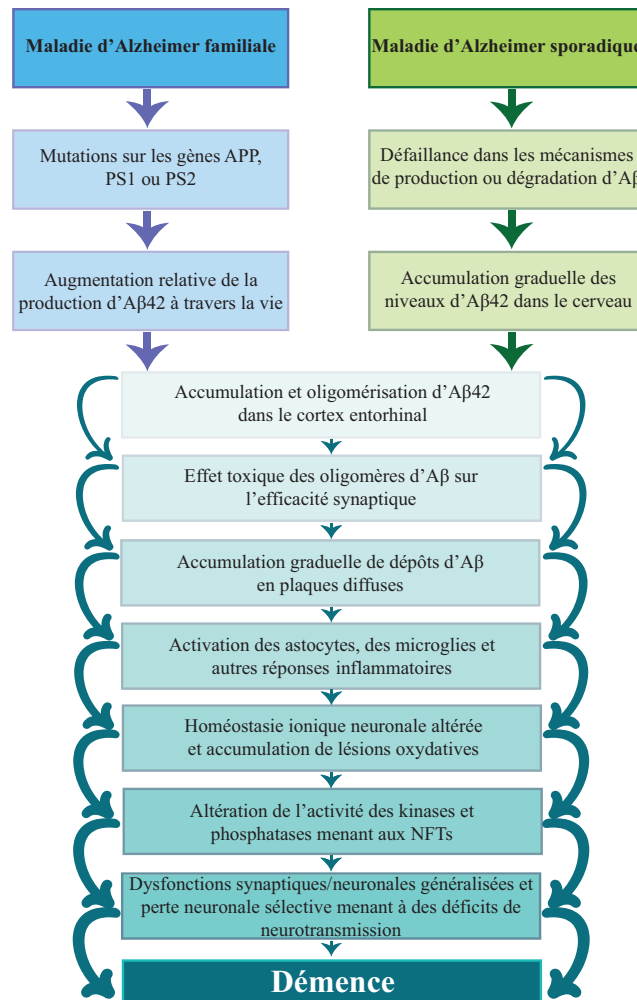


Figure 4. Séquence des évènements pathologiques majeurs menant à la maladie d'Alzheimer proposée par l'hypothèse de la cascade amyloïde

Les FAD sont causées par des mutations d'APP, de PS1 ou de PS2. Ces mutations augmentent la production d'Aβ42. Dans le cas des SAD, une combinaison d'éléments crée une défaillance de la production et/ou de la dégradation d'Aβ42. Cette défaillance engendre une accumulation graduelle d'Aβ42 dans le cerveau. La suite de la progression est la même pour les deux formes de maladie d'Alzheimer. L'accumulation d'Aβ42 mène à son oligomérisation qui exerce un effet toxique sur l'efficacité synaptique, puis l'Aβ se retrouve dans des plaques diffuses. L'Aβ cause l'activation des astrocytes et des microglies, l'altération de l'homéostasie ionique et l'accumulation de lésions oxydatives. De plus, l'altération de l'activité des kinases et phosphatases cause la formation des NFTs. Finalement, les dysfonctions synaptiques et neuronales de plus en plus généralisées mènent à la perte neuronale et à des déficits de neurotransmission observés cliniquement par la démence; Image produite par Sara Licea modifiée de (Selkoe & Hardy, 2016); « Aβ » : bêta-amyloïde; « APP » : précurseur de la protéine amyloïde; « PS1/PS2 » : préséniline 1 et 2; « NFTs » : enchevêtrements neurofibrillaires.

Facteurs supportant l'hypothèse que l'APP (précurseur de la protéine amyloïde) initie la maladie d'Alzheimer

Plusieurs éléments militent en faveur de cette hypothèse (Tableau IV) incluant les FAD, les autres anomalies géniques et les études avec des modèles transgéniques.

Les mutations causant la maladie d'Alzheimer

Comme mentionné plus tôt, seules les mutations d'APP et de PS1/PS2 ont été trouvées dans les cas de FAD. De plus, ces mutations causent toutes un déséquilibre dans la production d'A β (Khanahmadi *et al.*, 2015). Cependant, à ce jour, aucune mutation de la protéine Tau ne cause la maladie d'Alzheimer (Buée *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Khanahmadi *et al.*, 2015).

La Trisomie 21 et les autres anomalies du chromosome 21 impliquent l'APP (précurseur de la protéine amyloïde)

Un autre élément supportant l'hypothèse de la cascade amyloïde se trouve chez les personnes atteintes de la Trisomie 21 (syndrome de Down). Ces individus sont porteurs d'une 3^e copie du chromosome 21, donc de 3 copies du gène de l'APP. Ces personnes développent invariablement des neuropathologies typiques de la maladie d'Alzheimer. Il a été remarqué chez les patients trisomiques décédés en début d'adolescence qu'ils ont une abondance de plaques diffuses sans dystrophies neuronales, microglioses, astrocytoses ou formation de NFTs. Toutes ces neuropathologies apparaissent graduellement en fin d'adolescence (Selkoe & Hardy, 2016). Ces données suggèrent que la surexpression d'APP menant à la pathologie d'A β se trouve en amont des autres pathologies dans la maladie d'Alzheimer. En fait, non seulement tous les individus atteints de trisomie 21 développent des dépôts d'A β suivi des autres pathologies, mais certains développent ces dépôts d'A β dès l'âge de 8 ans (Lott, 2012; Chami *et al.*, 2016). Ces cas illustrent qu'une surexpression d'APP est suffisante pour causer la pathologie de la maladie d'Alzheimer (Selkoe & Hardy, 2016).

Il existe aussi de rares cas où des individus ont une translocation de la partie distale du chromosome 21. Ces personnes n'ont donc pas de triplicata du gène de l'APP. De façon

intéressante, ils ont, tout compte fait, le syndrome de Down sans avoir la maladie d'Alzheimer (Prasher *et al.*, 1998; Selkoe & Hardy, 2016). Par ailleurs, de rares individus qui ont une microduplication du gène de l'APP, mais non pas du reste du chromosome 21, développent la maladie d'Alzheimer typiquement dans leur mi-cinquantaine sans avoir le syndrome de Down (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006; Selkoe & Hardy, 2016).

Les études in vivo chez les modèles animaux et celles avec des iPSC (de l'anglais induced pluripotent stem-cell) favorisent l'hypothèse de la cascade amyloïde.

L'utilisation de souris transgéniques et de cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem-cell* – « iPSC ») aide grandement à la compréhension des événements séquentiels menant au développement de la maladie d'Alzheimer. Tout d'abord, appliquer des oligomères d'A β obtenus de cerveaux humains atteints de la maladie d'Alzheimer induit l'hyperphosphorylation de la protéine Tau à des épitopes importants pour la maladie d'Alzheimer en plus de causer des dystrophies de neurites dans des cerveaux et dans des cultures neuronales de souris exprimant une protéine Tau humaine (Ferrari *et al.*, 2003; Götz *et al.*, 2004). La coadministration avec des anticorps contre l'A β , séquestrant ainsi les oligomères d'A β appliqués, prévient totalement ces phénotypes (Jin *et al.*, 2011).

De plus, croiser des souris surexprimant l'APP humain non mutant à des souris surexprimant la protéine Tau humaine non mutante augmente significativement les NFTs, sans changer l'accumulation d'A β (Lewis *et al.*, 2001; Götz *et al.*, 2004; Ittner & Götz, 2011). Ainsi, la pathologie de l'A β semble promouvoir la pathologie de la protéine Tau dans des souris APP. Dans le même ordre d'idée, croiser des souris mutantes FAD-APP à des souris mutantes MAPT (Tau) augmente les NFTs sans toutefois modifier la pathologie d'A β (Lewis *et al.*, 2001; Terwel *et al.*, 2008; Ittner & Götz, 2011). Ainsi, la pathologie de la protéine Tau ne potentialise pas la pathologie d'A β dans des souris MAPT. Par ailleurs, les mutations héréditaires de l'APP ou de la PS causent des dépôts précoces d'A β suivis d'une accumulation de NFTs avec la protéine Tau sauvage chez les humains (Lemere *et al.*, 1996a; Bateman *et al.*, 2012) alors que les mutations dans le gène de la protéine Tau mènent à une démence fronto-temporale sans accumulation d'A β (Selkoe & Hardy, 2016). Aussi, l'immunisation contre

l'A β dans les souris 3xTg-AD diminue les niveaux d'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Oddo *et al.*, 2004).

Finalement, le développement de neurones à partir d'iPSC dérivées de patients atteints de la maladie s'avère très prometteur pour un modèle « humanisé » de la maladie d'Alzheimer nous permettant de démêler les différents aspects de la pathogenèse (Ooi *et al.*, 2013; Chami *et al.*, 2016). L'utilisation de neurones induits à partir de biopsies de patients avec des FAD a montré que d'abord survient l'accumulation d'A β suivie d'altérations de la protéine Tau. Ceci se fait en absence de surexpression comme c'est le cas dans la plupart des souris transgéniques. Ces données suggèrent également que l'A β promeut la pathologie de Tau (Shi *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2014; Muratore *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2015; Selkoe & Hardy, 2016).

Tableau IV. Observations soutenant le rôle clé du problème homéostatique du métabolisme de l'APP dans l'initiation de la maladie d'Alzheimer

Explications	
Mutations	<ul style="list-style-type: none"> > Les mutations entourant la région d'Aβ dans l'APP causent des formes agressives de FAD. > L'hérédité d'une mutation faux-sens dans l'APP causant une diminution de la production et de l'agrégation d'Aβ protège contre la maladie d'Alzheimer et le déclin cognitif associé à l'âge. > Des mutations faux-sens dans la PS1 et la PS2 sont les formes les plus communes de FAD. Ces mutations mènent à une augmentation de la production d'Aβ.
Trisomie 21 (syndrome de Down) et autres anomalies du chromosome 21	<ul style="list-style-type: none"> > Les patients atteints de Trisomie 21 ont trois copies de l'APP et tous développent des neuropathologies typiques de la maladie d'Alzheimer. > Les patients ayant la Trisomie 21 qui meurent avant la mi-adolescence ont une grande quantité de plaques diffuses sans toutefois avoir de dystrophies des neurites, de microglioses, d'astrocytoses et d'enchevêtrements neurofibrillaires. Tout cela apparaît graduellement avec l'âge. > Les patients avec une translocation de la partie distale du chromosome 21 n'ont pas de triplicata du gène de l'APP. Ces individus ont, en autres mots, le syndrome de Down sans avoir la maladie d'Alzheimer. Cependant, des individus ayant seulement une microduplication du gène de l'APP développent la maladie d'Alzheimer dans leur mi-cinquantaine sans avoir le syndrome de Down.
ApoE4	<ul style="list-style-type: none"> > L'allèle ApoE4 augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer entre autres en diminuant l'élimination d'Aβ, menant à son agrégation suivi par les autres caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.
Aβ	<ul style="list-style-type: none"> > Les oligomères d'Aβ42 isolés de cerveau de patients Alzheimer typiques (sporadiques) diminuent la densité synaptique, inhibent la LTP et augmentent la LTD lorsque appliqués dans des hippocampes de rongeurs. De plus, l'injection intraventriculaire de ces Aβ42 perturbe la mémoire de rats adultes autrement en santé. > Les oligomères d'Aβ se retrouvent aux alentours des plaques séniles. Les synapses diminuent suivant un gradient, c'est-à-dire que les synapses sont plus fortement diminuées en s'approchant de la bordure de la plaque. > L'administration d'oligomères d'Aβ42 induit l'hyperphosphorylation de la protéine Tau à des épitopes pertinents et cause des dystrophies neuritiques dans des cultures de neurones de rats. Cependant, la co-administration de ces oligomères avec des anticorps contre les oligomères d'Aβ42 prévient totalement ces phénotypes. > D'autres protéines amyloïdes causent des défaillances d'organes progressives. Diminuer de façon thérapeutique l'amyloïde ou son précurseur a des effets bénéfiques chez les patients.
Biomarqueurs	<ul style="list-style-type: none"> > Des études récentes avec de nouveaux biomarqueurs indiquent qu'un bas niveau d'Aβ42 dans le CSF et une imagerie amyloid-PET positive précèdent les autres changements reliés à la maladie d'Alzheimer de plusieurs années (augmentation de la protéine Tau dans le CSF, diminution du métabolisme du glucose, atrophie cérébrale, démence clinique).

Modifié de Selkoe et Hardy, 2016. « Aβ »: bêta-amyloïde; « amyloid-PET »: de l'anglais *Amyloid positron emission tomography imaging*; « APP »: précurseur de la protéine amyloïde; « CSF »: de l'anglais *Cerebrospinal fluid*; « FAD »: de l'anglais *Familial Alzheimer's disease*; « LTD »: de l'anglais *Long-term depression*, « LTP »: de l'anglais *Long-term potentiation*, « PS1/2 »: préséniline 1 et 2

Problème majeur avec l'hypothèse de la cascade amyloïde

Braak et Braak (Braak & Braak, 1991) ont créé un système histopathologique qui est désormais largement utilisé afin d'établir la sévérité neurohistopathologique de la maladie d'Alzheimer. Cette échelle décrit principalement la progression des changements du cytosquelette, c'est-à-dire des NFTs et des neurites dystrophiques ainsi que plus récemment des changements de la phosphorylation de la protéine Tau {Braak, 2006 #910; Braak, 2011 #909}. Puisque les ceux-ci corrélaient mieux avec le déclin cognitif que les plaques amyloïdes, cette échelle a longtemps affaibli l'hypothèse que l'amyloïde et non pas la protéine Tau amorce la maladie d'Alzheimer. Cependant, à la création du système histopathologique de Braak et Braak, les outils pour détecter les formes oligomériques d'A β n'étaient pas au point et seules les plaques amyloïdes ont été observées (Selkoe & Hardy, 2016).

La protéine Tau et ses fonctions normales

Grundke-Iqbal et collègues (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b) identifièrent la protéine Tau comme la source des NFTs en 1986. La protéine Tau se trouve sur le chromosome 17 (Neve *et al.*, 1986) et à ce jour aucune mutation de la protéine Tau causant le développement de la maladie d'Alzheimer n'a été identifiée (Khanahmadi *et al.*, 2015). Il existe 6 isoformes de la protéine Tau dans le cerveau humain. Ces isoformes diffèrent par des répétitions semi-conservées dans le domaine d'assemblage des microtubules. Il peut y avoir 3 ou 4 répétitions en tandem, référant à Tau3R et Tau4R respectivement (Goedert *et al.*, 1989; Khanahmadi *et al.*, 2015). La protéine Tau possède au moins 84 sites de phosphorylation desquels 45 sont des sérines, 35 des thréonines et 4 des tyrosines. La protéine Tau est généralement plus phosphorylée pendant le développement du cerveau que dans les neurones matures (Ittner & Götz, 2011; Maqbool *et al.*, 2016). Cependant, son hyperphosphorylation dans les neurones matures mène aux NFTs (Ballatore *et al.*, 2007).

La protéine Tau est une protéine normalement axonale qui participe, entre autres, à l'intégrité structurelle des microtubules grâce à son domaine de liaison à ceux-ci (Ittner &

Götz, 2011). En effet, la protéine Tau maintient la structure des polymères de tubuline formant le cytosquelette du neurone (Kepp, 2012). La protéine Tau joue également un rôle dans l'assemblage et l'élongation des microtubules (Brandt & Lee, 1993; Al-Bassam *et al.*, 2002).

Tauopathies et NFTs (enchevêtrements neurofibrillaires)

Bien qu'aucune mutation de la protéine Tau n'ait été trouvée comme cause de la maladie d'Alzheimer, certaines de ces mutations causent d'autres démences. Les tauopathies sont un regroupement de pathologies ayant en commun l'existence des NFTs. Par exemple, la démence fronto-temporale peut être causée par une mutation de la protéine Tau, maladie alors nommée démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (*Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*) (Poorkaj *et al.*, 1998; Buée *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). L'hyperphosphorylation de la protéine Tau mène à sa dissociation des microtubules, son accumulation dans les compartiments somato-dendritiques des neurones, son agrégation et finalement à la formation de NFTs (Figure 5) (Götz *et al.*, 1995; Ittner & Götz, 2011).

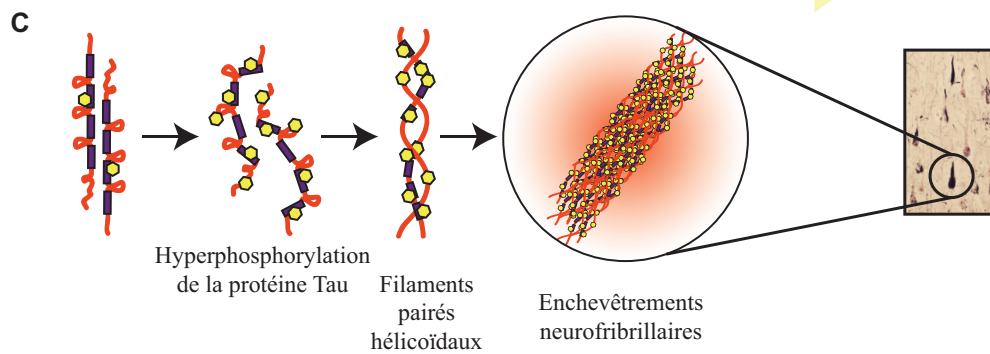
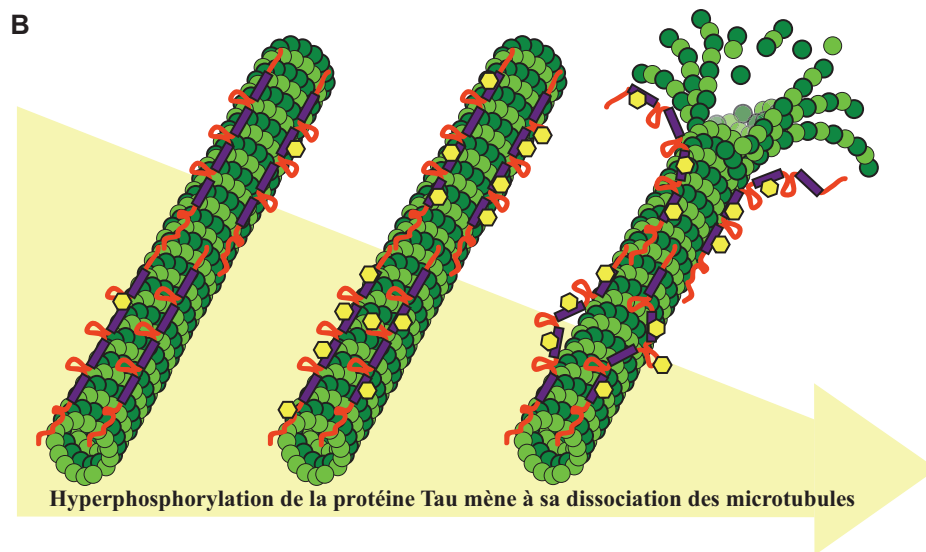
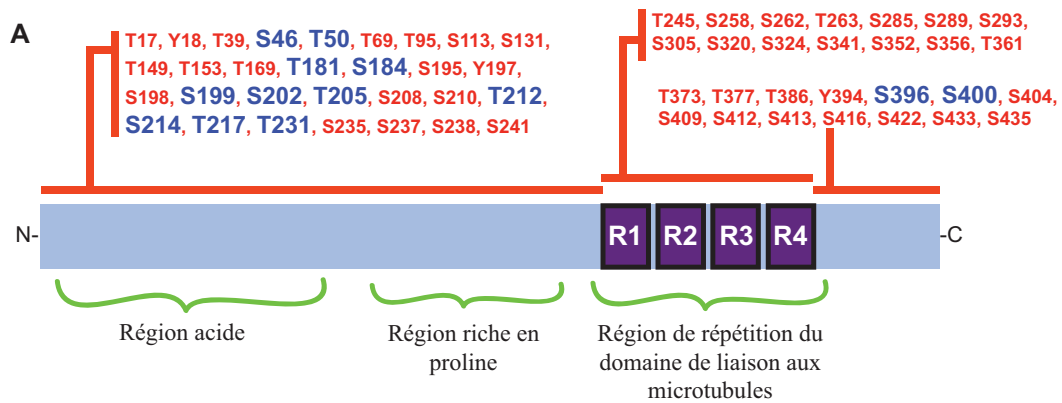


Figure 5. La protéine Tau et la formation des NFTs (enchevêtrements neurofibrillaires)

(A) Représentation schématique de la protéine Tau441 humaine montrant plus de 50 sites de phosphorylation observés sur la protéine Tau hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer. En bleu, les sites pouvant être phosphorylés par la GSK3; Image produite par Sara Licea, modifiée de (Li & Paudel, 2006; Wang *et al.*, 2013); (B) La protéine Tau ne maintient plus l'intégrité structurelle des microtubules lorsqu'elle est hyperphosphorylée; Image produite par Sara Licea; (C) L'hyperphosphorylation de la protéine Tau mène aux NFTs; Image produite par Sara Licea; Immunocoloration Bielschowsky modifiée tirée de (Janssen *et al.*, 2000); « R1-R4 » : régions de répétition; « NFTs » : enchevêtrements neurofibrillaires; « S » : sérine; « T » : thréonine, « Y » : tyrosine.

Hypothèse revisitée : axe de Tau

Les oligomères d'Aβ (bêta-amyloïde) et non les plaques amyloïdes causent la toxicité cellulaire.

Des études plus récentes démontrent qu'avec de nouvelles analyses biochimiques, le fardeau d'Aβ corrèle étroitement avec la détérioration cognitive contrairement aux plaques amyloïdes (Morris *et al.*, 2009; Jack *et al.*, 2010). En effet, la coexistence des différentes formes d'Aβ dans les cerveaux Alzheimer a rendu la détermination de la principale forme toxique difficile (Hardy & Selkoe, 2002). Plusieurs éléments de preuves ont convergé pour montrer que les oligomères d'Aβ solubles causent la neurotoxicité et les dysfonctions synaptiques (Hardy & Selkoe, 2002; Kamenetz *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2010b). En effet, les souris surexprimant des formes mutantes d'APP humain ont des défauts cognitifs avant d'avoir des plaques détectables, appuyant l'idée que l'Aβ soluble soit la forme toxique (Games *et al.*, 1995; Hsiao *et al.*, 1996). De plus, l'application d'oligomères d'Aβ42, isolés des cerveaux de personnes décédées de SAD, aux hippocampes de rongeurs vient diminuer la densité synaptique, inhiber la LTP et augmenter la LTD. Aussi, l'injection de ces oligomères perturbe la mémoire chez les rats adultes autrement en santé (Kamenetz *et al.*, 2003; Shankar *et al.*, 2008; Selkoe & Hardy, 2016).

L'association intime des oligomères solubles et le déclin cognitif a élégamment été montrée avec des méthodes immuno-enzymatiques ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – « ELISA ») sélectives. L'étude voulait élucider un problème de l'hypothèse de la cascade amyloïde. En effet, il avait été trouvé que certains individus ont une grande charge de plaques amyloïdes sans avoir de déclin cognitif alors que d'autres ont moins de plaques amyloïdes et un déclin cognitif prononcé (Katzman *et al.*, 1988; Aizenstein *et al.*, 2008; Selkoe & Hardy, 2016). L'étude a été réalisée en utilisant des tissus cérébraux *post mortem* de patients qui étaient cliniquement normaux et d'autres cliniquement déments sélectionnés pour leur fardeau similaire de plaques séniles. Cependant, l'ELISA sélective pour les oligomères a montré que les patients non déments, malgré leur fardeau de plaques séniles, avaient un ratio oligomère/plaque beaucoup plus faible que les cerveaux des patients déments (Esparza *et al.*, 2013; Selkoe & Hardy, 2016). Ces résultats supportent l'hypothèse de Selkoe et Hardy (Selkoe

& Hardy, 2016) voulant que les plaques puissent séquestrer les oligomères solubles jusqu'à ce qu'elles atteignent leur limite physique. Ces plaques seraient donc plus le phénomène d'une tentative de neuroprotection. Suite à la saturation des plaques, les excès d'oligomères pourraient être diffusés dans les membranes synaptiques environnantes (Selkoe & Hardy, 2016).

Pendant plusieurs années, il était difficile d'avoir une compréhension complète de la séquence pathologique de la maladie d'Alzheimer puisqu'il était difficile de détecter cette séquence directement dans des patients vivants (Selkoe & Hardy, 2016). Aujourd'hui, les changements pathologiques d'A β sont les premières altérations qui peuvent être mesurées et utilisées de façon diagnostique (Lewczuk *et al.*, 2015).

Nouvelle hypothèse : la protéine Tau est nécessaire à la toxicité induite par l'A β (bêta-amyloïde).

Malgré que l'A β semble être l'élément déclencheur de la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau serait essentielle dans sa pathogenèse. En effet, il a d'abord été montré que l'inhibition de la protéine kinase 1 de Tau (*Tau Protein Kinase 1* – « TPKI » – maintenant appelé GSK3) protégeait contre la mort cellulaire induite par l'A β (Takashima *et al.*, 1998). De la même façon, la réduction de la protéine Tau prévient également les déficits neuronaux induits par l'A β dans des neurones en culture de souris Tau *knockout* (Tau $^{-/-}$) (Rapoport *et al.*, 2002; Ittner & Götz, 2011). Ces données ont été également reproduites *in vivo* (Roberson *et al.*, 2007; Ittner *et al.*, 2010). Ainsi, bien qu'A β agit en amont de la protéine Tau, ses effets néfastes dépendent en grande partie de la protéine Tau (Ittner & Götz, 2011; Morris *et al.*, 2011; Huang & Mucke, 2012).

Il semble que la protéine Tau hyperphosphorylée interfère avec des fonctions neuronales, comme le transport axonal, avant de s'agréger en NFTs (Ittner *et al.*, 2009). De plus, la protéine Tau hyperphosphorylée est relocalisée dans les compartiments somato-dendritiques et c'est justement cette relocalisation qui augmenterait la vulnérabilité aux effets toxiques d'A β (Götz *et al.*, 1995; Santacruz *et al.*, 2005; Ittner & Götz, 2011). L'A β se trouve aux jonctions synaptiques et altère la transmission synaptique via l'augmentation de la

transmission des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartique) (Selkoe, 2002; Hoe *et al.*, 2009). Récemment, les rôles de la protéine Tau et de la kinase Fyn dans la toxicité induite par l'A β ont été décrits. En effet, la protéine Tau interagit avec la tyrosine kinase Fyn en la séquestrant et en modifiant sa localisation cellulaire (Lee *et al.*, 1998; Haass & Mandelkow, 2010). Fyn peut phosphoryler une sous-unité du récepteur NMDA. Cette phosphorylation stabilise le récepteur à la membrane par son interaction avec PSD95 (de l'anglais *Post-Synaptic Density* 95) (Haass & Mandelkow, 2010), une protéine d'échafaudage dans les épines dendritiques des neurones. Cette stabilisation cause une augmentation de la transmission par les récepteurs NMDA résultant en une augmentation de la toxicité d'A β (Haass & Mandelkow, 2010). Ainsi, la relocalisation de la protéine Tau vers les compartiments somato-dendritiques favorise la sensibilisation des récepteurs NDMA via l'interaction de la protéine Tau hyperphosphorylée avec Fyn (Ittner & Götz, 2011),

Pour ces raisons, Ittner et Götz (Ittner & Götz, 2011) formulèrent l'hypothèse de l'axe de Tau (Figure 6). Cette hypothèse agrmente l'hypothèse de la cascade amyloïde en y ajoutant le rôle essentiel de la protéine Tau. En somme, l'A β serait toujours le déclencheur du développement de la maladie d'Alzheimer, mais cette toxicité serait Tau dépendante (Ittner & Götz, 2011), indiquant la nécessité de s'intéresser également à la protéine Tau dans l'élaboration de traitements pour la maladie d'Alzheimer.

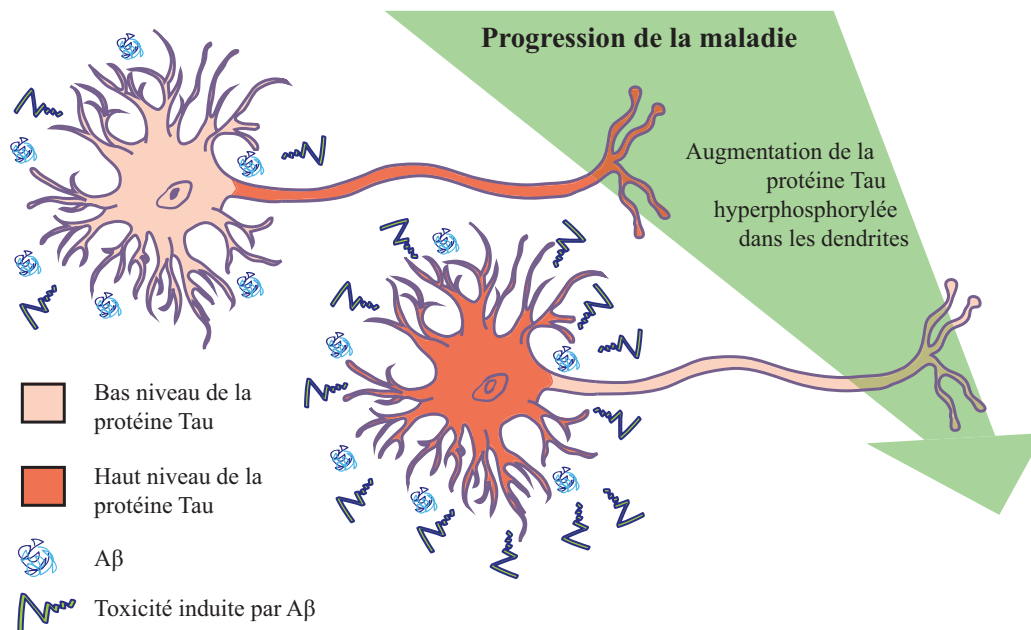


Figure 6. Hypothèse de l'axe de la protéine Tau proposée par Ittner et Götz

L'A β agit en amont de la protéine Tau, mais sa toxicité est Tau dépendante. Il y a une relocalisation somato-dendritique de la protéine Tau hyperphosphorylée qui mène à une augmentation de la vulnérabilité du neurone aux effets toxiques d'A β ; Image produite par Sara Licea, modifiée de (Ittner & Götz, 2011); « A β » : bêta-amyloïde.

Traitements pour la maladie d'Alzheimer

Diagnostic: les biomarqueurs

De récents progrès permettent désormais de détecter des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer chez des patients vivants, améliorant le diagnostic ainsi que la sélection de sujets pour les études cliniques (Huang & Mucke, 2012). Il existe présentement cinq biomarqueurs qui se divisent en deux groupes: (a) ceux des dépôts d'A β et (b) ceux de la neurodégénération (Lewczuk *et al.*, 2015) (Figure 7).

Les biomarqueurs du premier groupe sont (a) la présence et la quantification d'A β 42 dans le liquide cébrospinal (*Cerebrospinal fluid* – « CSF ») et (b) la quantification de

l'absorption de traceurs d'amyloïdes par tomographie par émission de positrons (*Amyloid positron emission tomography imaging – Amyloid « PET » imaging*) avec le *Pittsburg compound B* (PiB) (Fagan *et al.*, 2006; Lewczuk *et al.*, 2015). En effet, pour poser un diagnostic de la maladie d'Alzheimer, la combinaison de la diminution d'Aβ42 et l'accumulation du PiB sont nécessaires. L'hypothèse favorisée présentement quant à la diminution d'Aβ42 dans le CSF est que l'épitope pour l'Aβ42 devient inaccessible suite à l'accumulation et l'agrégation d'Aβ42 monomères en oligomères (Lewczuk *et al.*, 2015). Supportant cette hypothèse, l'absorption de traceurs d'amyloïdes par imagerie PiB-PET augmente parallèlement à la baisse d'Aβ42 dans le CSF (Figure 7). Il existe une très forte corrélation entre la liaison du PiB et les dépôts d'Aβ fibrillaires dans les cerveaux de patients ayant subi une imagerie PiB-PET pendant leur vie ainsi qu'un examen neuropathologique *post mortem* (Ikonomovic *et al.*, 2008; Lewczuk *et al.*, 2015). En effet, après l'injection de PiB dans le flux sanguin, celui-ci traverse la barrière hématoencéphalique (*Blood-brain barrier – « BBB »*) et se lie aux dépôts d'Aβ fibrillaires. C'est pourquoi son accumulation anormale dans le cerveau est désormais un critère pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Cohen & Klunk, 2014; Lewczuk *et al.*, 2015).

Les biomarqueurs du deuxième groupe, le groupe de la neurodégénération, sont (a) la quantification de la protéine Tau dans le CSF, (b) le métabolisme du glucose par tomographie par émission de positrons de fluodeoxyglucose ¹⁸F (de l'anglais *Fluodeoxyglucose positron emission tomography – « FDG-PET »*) et finalement (c) l'imagerie par résonance magnétique (« IRM ») structurelle (Lewczuk *et al.*, 2015). L'augmentation des concentrations de la protéine Tau est observée dans le CSF de patients avec plusieurs désordres neuropsychiatriques incluant la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi la protéine Tau est considérée un biomarqueur des lésions neuronales qui corrèle fortement avec la neurodégénération et le déclin cognitif et non pas directement avec la maladie d'Alzheimer (Kim *et al.*, 2010; Lewczuk *et al.*, 2015). Les patients atteints de maladie d'Alzheimer manifestent également une diminution d'absorption de FDG et cette diminution corrèle avec la détérioration cognitive (Fukuyama *et al.*, 1994; Minoshima *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 2004; Anchisi *et al.*, 2005; Drzezga *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014; Cohen & Klunk, 2014; Lewczuk *et al.*, 2015). Finalement, l'IRM structurelle fournit des informations

sur l'atrophie cérébrale. Cette atrophie corrèle elle aussi avec la détérioration cognitive (Fox *et al.*, 1999; Lewczuk *et al.*, 2015).

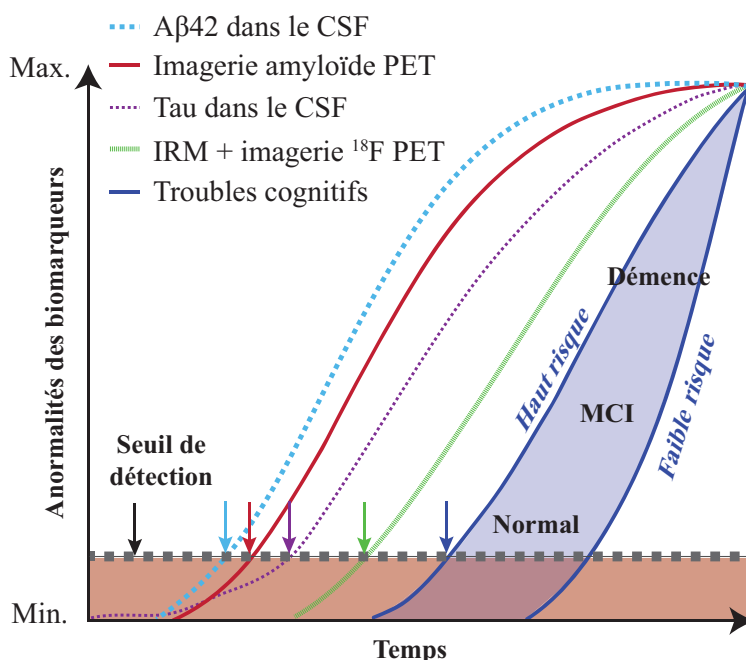


Figure 7. Un modèle temporel hypothétique intégrant les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer.

La ligne horizontale pointillée grise représente le seuil de détection des biomarqueurs associés aux changements pathologiques observés avec la maladie d'Alzheimer. Les premiers biomarqueurs à franchir le seuil sont des marqueurs de l'amyloïde. Note : le graphique montre le changement anormal des biomarqueurs. Dans le cas de l'Aβ42 dans le CSF, ceci représente une diminution; Image produite par Sara Licea, modifiée de (Jack Jr *et al.*, 2013; Selkoe & Hardy, 2016); « ¹⁸F » : fluodeoxyglucose; « Aβ » : bêta-amyloïde; « CSF » : de l'anglais *Cerebrospinal fluid*; « PET » : de l'anglais *Positron emission tomography*; « IRM » : imagerie par résonance magnétique, « MCI » : de l'anglais *Mild cognitive impairment*.

Traitements actuels

Malgré les efforts considérables consacrés à l'étude de la maladie d'Alzheimer, nous n'avons toujours pas de traitements efficaces. La maladie d'Alzheimer semble être associée avec des niveaux amoindris du neurotransmetteur acétylcholine et avec une hyperstimulation neuronale aberrante des récepteurs NMDA par le neurotransmetteur glutamate (Farlow *et al.*,

2008; Huang & Mucke, 2012; Kumar *et al.*, 2015). Ainsi, les uniques stratégies thérapeutiques actuellement disponibles sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (de l'anglais *Acetylcholinesterase inhibitor* – « AChEI ») et les antagonistes des récepteurs NMDA (Auld *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2015). Les AChEI augmentent la neurotransmission cholinergique qui est déficiente chez les patients Alzheimer en inhibant l'enzyme qui détruit normalement l'acétylcholine. Les seuls traitements AChEI approuvés au Canada incluent la rivastigmine, la galantamine et le donepezil. Le seul traitement approuvé au Canada inhibant les récepteurs NMDA est la mémantine (Alzheimer Society Canada, consulté le 13 juin 2016). La mémantine est un antagoniste qui bloque le récepteur en s'y liant et en le coinçant dans une conformation particulière (Kumar *et al.*, 2015). Dans les animaux modèles de la maladie d'Alzheimer, la mémantine améliore l'apprentissage spatial, protège les neurones de la toxicité induite par l'A β , diminue l'apoptose, diminue les dommages faits par les radicaux libres et rétablit la dégénération synaptique (Miguel-Hidalgo *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015). La mémantine est le seul médicament qui semble avoir des effets sur les stades plus avancés de la maladie (Farlow *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2015).

Cependant, chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer ces stratégies ne font que retarder la progression des symptômes associés avec la maladie de façon modeste et transitoire en repoussant le moment du placement en institution du patient (Lopez *et al.*, 2009; Huang & Mucke, 2012). De plus, plusieurs de ces médicaments ont des effets secondaires graves. Par exemple, la tacrine, un médicament toujours approuvé aux États-Unis, mais non au Canada cause de graves dommages au foie (Farlow *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2015). Les plus grands problèmes avec tous ces traitements sont qu'au moins la moitié des gens qui les utilisent n'y répondent pas (Farlow *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2015) et qu'il n'y a pas de preuves convaincantes que ces agents préviennent, interrompent ou même renversent vraiment la maladie (Huang & Mucke, 2012).

Les hauts et les bas des vaccins contre l'Alzheimer

Solomon et collègues (Solomon *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 1997) démontrèrent que l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre l'A β de façon *in vitro* prévenait l'agrégation des

monomères d'A β et favorisait la dissolution des agrégats d'A β . Ces recherches ouvraient la voie à de potentiels traitements par immunothérapie pour la maladie d'Alzheimer. Il existe deux types d'immunisation : l'immunisation active et l'immunisation passive. La vaccination est un type d'immunisation active puisqu'elle active le système immunitaire après l'exposition à un antigène pour produire des anticorps contre celui-ci (Lemere & Masliah, 2010). Cette forme d'immunisation confère une immunité à long terme puisque le corps est en mesure de produire lui-même les anticorps. L'immunisation passive contourne le besoin du corps de produire les anticorps en les délivrant directement par injection dans le patient (Lemere & Masliah, 2010).

Schenk et collègues (Schenk *et al.*, 1999) rapportèrent les premiers résultats indiquant que l'immunisation active contre l'A β réduisait la pathologie d'A β *in vivo* chez les souris PDAPP. La vaccination de ces souris prévenait la formation de plaques amyloïdes et diminuait également les plaques déjà présentes dans les cerveaux des rongeurs (Schenk *et al.*, 1999). Plusieurs études ont reproduit ces résultats avec divers modèles transgéniques montrant le potentiel de cette thérapie chez l'humain (Lemere & Masliah, 2010). Dans ces études, l'immunisation active était faite avant ou au début de l'apparition de la maladie (Lemere & Masliah, 2010). Le besoin d'intervenir tôt dans la maladie a été observé avec l'immunisation des souris modèles 3xTg-AD puisqu'alors que la vaccination des jeunes animaux n'ayant pas encore de plaques séniles prévenait l'apparition de ces plaques, cette même vaccination chez des souris plus âgées ayant déjà des plaques était vraiment moins efficace (Das *et al.*, 2001). De plus, cette vaccination ne changeait pas la pathologie chez des souris avec les phénotypes Alzheimer bien établis (Lemere & Masliah, 2010).

La première étude clinique de la vaccination contre l'A β débuta en décembre 1999 avec le vaccin AN1792 consistant en un peptide synthétique d'A β et l'adjuvant QS-21, un stimulateur de système immunitaire (Robinson, 2016). En janvier 2002, l'étude clinique, désormais en phase IIa, a été arrêtée brusquement puisque 6% des patients avaient développé une méningo-encéphalite en raison de la réponse des lymphocytes T contre l'A β cérébrale (Lemere & Masliah, 2010; Robinson, 2016). Malgré les effets secondaires négatifs, les évaluations cliniques des patients montraient que la production d'anticorps avait fonctionné, que cela menait à une baisse des niveaux d'A β et une plus petite quantité du fardeau en

plaques séniles (Lambracht-Washington & Rosenberg, 2013). En raison des effets secondaires, l'immunisation active a été laissée en arrière-scène en faveur de l'immunothérapie passive qui ne provoque pas la réactivité des lymphocytes T (Robinson, 2016). Cependant, la réalisation que la pathologie d'A β s'accumule pendant des années avant l'apparition des premiers symptômes démontre le besoin d'utiliser les nouveaux outils diagnostique de neuroimagerie dans les essais cliniques (Robinson, 2016). Ceci pourrait, entre autres, expliquer les résultats de plusieurs essais cliniques négatifs. C'est pourquoi, de nos jours, les essais cliniques tentent d'inscrire des patients avec un faible phénotype Alzheimer ou qui sont encore présymptomatiques. C'est le cas d'un essai clinique avec crenezumab, une étude faite sur des patients présymptomatiques porteurs de mutations dominantes de PS (Robinson, 2016).

La cascade menant à la maladie d'Alzheimer serait causée par l'A β , mais le rôle des autres caractéristiques pathologiques, comme la protéine Tau, est loin d'être négligeable. Pour cette raison, il faut également s'intéresser à d'autres approches thérapeutiques. En effet, les traitements ciblant l'A β fonctionneraient probablement mieux chez des patients présymptomatiques alors que des traitements ciblant la protéine Tau seraient nécessaires pour traiter des stades plus avancés de la maladie (Underwood, 2015).

Cependant, un vrai vaccin, s'il peut être sécuritaire, est beaucoup plus pratique qu'une infusion mensuelle d'anticorps qui est plus coûteuse et comporte des défis logistiques (Robinson, 2016). Ainsi, malgré les échecs passés, l'immunisation active est revisitée depuis quelques années avec une deuxième génération de vaccins. Ces nouveaux vaccins sont conçus de façon à ne pas éliciter les lymphocytes T pour ne pas recréer les effets secondaires dangereux obtenus avec la première génération (Galimberti & Scarpini, 2016). Ces essais cliniques montrent pour l'instant une réponse positive des anticorps sans signe de réaction inflammatoire auto-immune (Lambracht-Washington & Rosenberg, 2013). Un autre changement dans la méthode est de recruter et tester la vaccination chez des patients présymptomatiques. Par exemple, une de ces études, présentement en phase III, cherche à tester l'immunisation active avec CAD106, composé d'une petite portion d'A β liée à une particule similaire à un virus, dans une cohorte de plus de 1300 personnes cognitivement normales, mais avec un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer (Underwood,

2015; Ankarcrona *et al.*, 2016; Galimberti & Scarpini, 2016). L'idée derrière cette étude clinique est d'arrêter de façon préventive la maladie (Underwood, 2015; Robinson, 2016).

La maladie d'Alzheimer : une maladie majoritairement sporadique

Seulement 1% des cas de maladie d'Alzheimer seraient des cas familiaux (Webb & Murphy, 2012). À ce jour, les autres cas n'ont pas de causes claires. Ceci est dû au fait que la maladie d'Alzheimer est probablement causée par des interactions complexes entre plusieurs facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. Cependant, plusieurs facteurs de risques sont connus.

L'âge et le sexe sont des facteurs risques de développer la maladie d'Alzheimer.

L'âge serait le facteur de risque le plus important. En effet, la prévalence de la maladie d'Alzheimer augmente en vieillissant (McKhann *et al.*, 1984; Farrer *et al.*, 1997; Khanahmadi *et al.*, 2015). Par ailleurs, les femmes courent un risque plus élevé de développer la maladie et ce risque est corrélé au déclin d'œstrogène post-ménopausal (Farrer *et al.*, 1997; Khanahmadi *et al.*, 2015).

Être porteur de l'allèle ApoE4 augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer.

L'importance de l'apolipoprotéine E4 (ApoE4) comme facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer a été découverte en 1993 (Corder *et al.*, 1993; Selkoe & Hardy, 2016). Il existe trois isoformes d'ApoE qui ne diffèrent que d'un acide aminé : ApoE2, ApoE3 et ApoE4 (Huang & Mucke, 2012). L'ApoE est majoritairement produite dans les astrocytes et son rôle principal est de transporter le cholestérol aux neurones (Huang & Mucke, 2012).

L'ApoE a également des rôles isoformes-spécifiques dans le remodelage des neurites: l'ApoE3 stimule la croissance neuritique alors que l'ApoE4 l'inhibe (Huang & Mucke, 2012). Les porteurs de l'allèle ApoE4 ont un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer. Ce risque est d'autant plus élevé s'ils sont doublement porteurs de l'allèle. L'ApoE4 favoriserait, entre autres, le développement de la maladie d'Alzheimer en réduisant l'élimination d'A β menant à son excès et son agrégation (Zekonyte *et al.*, 2016). Il s'ensuit alors la neuropathologie typique de la maladie d'Alzheimer en aval de ces agrégats (Polvikoski *et al.*, 1995; Selkoe & Hardy, 2016).

Avoir le diabète, plus particulièrement le diabète de type II, est un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer.

Le risque de développer une maladie quelconque augmente avec l'âge. La coexistence de maladies multiples dans un seul patient se nomme comorbidité. Ceci est un facteur important à considérer dans les études de santé et de cognition chez les personnes âgées (Brenner & Arndt, 2004; Nilsson, 2006a). Plus de 81% des patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont comorbides avec le diabète de type II ou montrent des niveaux glycémiques anormaux (Janson *et al.*, 2004). En tenant compte de cette comorbidité, des études longitudinales suggèrent tout de même que le diabète, en particulier le diabète de type II, est un facteur de risque pour la démence et la maladie d'Alzheimer (Ott *et al.*, 1999; Arvanitakis *et al.*, 2004; Janson *et al.*, 2004; Kopf & Frölich, 2009; Yang & Song, 2013; Chami *et al.*, 2016). Ces études ont démontré que les patients souffrant de diabète de type II sont de 2 à 3 fois plus à risque de développer la maladie d'Alzheimer, indépendamment des risques de démence vasculaire (Ott *et al.*, 1999; Zhao & Townsend, 2009).

Diabetes Mellitus

Histoire et définition

Les symptômes du diabète ont été décrits pour la première fois dans le papyrus de Thèbes 1500 av. J.-C. (Guest, 1964; Lakhtakia, 2013). Vers 230 av. J.-C., le grec Apollonius de Memphis inventa le terme *diabetes* (du grec: *dia* - à travers, *betes* – passer) (Zajac *et al.*, 2010). Cela référait alors à une faim excessive (polyphagie), une soif intense (polydipsie) et un volume urinaire important (polyurie) (Zajac *et al.*, 2010). Les médecins indiens appelaient cette maladie *madhumeha*, ou urine de miel, puisqu'elle attirait les fourmis. Au 5e siècle, deux médecins indiens, Sushruta et Charaka, furent en mesure d'identifier les deux types (type I et type II) (Zajac *et al.*, 2010; Lakhtakia, 2013). Malgré que le goût sucré de l'urine des patients diabétiques ait été noté dès l'Antiquité, ce n'est qu'en 1798 que John Rollo, un chirurgien de l'armée britannique, ajoutât le mot *mellitus* du latin « sucré comme le miel » au nom de la maladie (Zajac *et al.*, 2010; Lakhtakia, 2013). En 1889, Joseph von Mering et Oskar Minkowski attribuèrent un rôle important au pancréas puisqu'ils montrèrent qu'une pancréatectomie causait le diabète chez le chien (Zajac *et al.*, 2010; Lakhtakia, 2013). Une des plus grandes réussites médicales canadiennes, qui leur valurent l'obtention d'un prix Nobel en 1923, a été l'identification de l'insuline par Frederick Grant Banting, Charles Hebert Best et James Bertram Collip dans le laboratoire de James Rickard MacLeod en 1921 (Zajac *et al.*, 2010; Lakhtakia, 2013). L'insuline est majoritairement produite par le pancréas, plus précisément par les cellules bêta des îlots de Langerhans. De nos jours, le diabète est décrit comme un désordre métabolique complexe caractérisé par de l'hyperglycémie chronique associée à des complications micro- et macrovasculaires. Sa présentation clinique varie considérablement de l'asymptotisme passant par la polyurie, la polydipsie, l'acidocétose (acidité anormale du sang) jusqu'au coma (Yang & Song, 2013).

Types de diabète

Le diabète implique une défaillance de la signalisation de l'insuline menant à une accumulation de glucose sanguin et le défaut de son utilisation pour produire de l'énergie. La

cause de cette défaillance varie selon le type de diabète : pour le diabète de type I le corps ne peut pas produire l'insuline alors que pour le diabète de type II (*Type 2 diabetes* – « T2D ») le corps ne peut pas utiliser convenablement l'insuline produite (Canadian Diabetes Association, consulté le 13 juin 2016).

Le diabète de type I est une maladie auto-immune qui apparaît lorsque le système immunitaire attaque et détruit par erreur les cellules bêta du pancréas qui produisent l'insuline. Ceci mène à une déficience complète en insuline. Ce type de diabète se développe généralement à l'enfance ou l'adolescence (Ali, 2010; Leu & Zonszein, 2010). Le diabète de type I ne compterait que pour 5% à 10% des cas de diabète (Chamany & Tabaei, 2010; Canadian Diabetes Association, consulté le 13 juin 2016).

Le T2D est une maladie hétérogène caractérisée par des dérèglements métaboliques complexes avec deux principales anormalités: la résistance à l'insuline et les dysfonctions des cellules bêta pancréatiques (Leu & Zonszein, 2010). Plus de 90% des patients atteints de diabète ont le T2D. Ce type de diabète se développe généralement chez les adultes. Cependant, cette maladie se développe maintenant même chez les enfants (Alberti *et al.*, 2004; Bloomgarden, 2004; Chamany & Tabaei, 2010; Canadian Diabetes Association, consulté le 13 juin 2016).

Il existe aussi le diabète gestationnel. Il s'agit d'une forme temporaire de diabète compliquant environ 4% de toutes les grossesses, mais sa prévalence réelle pourrait varier entre 1-14%, selon la population (Leu & Zonszein, 2010). Ce type de diabète implique également un risque de développer le diabète permanent chez la mère et l'enfant (Leu & Zonszein, 2010; Canadian Diabetes Association, consulté le 13 juin 2016).

Prévalence

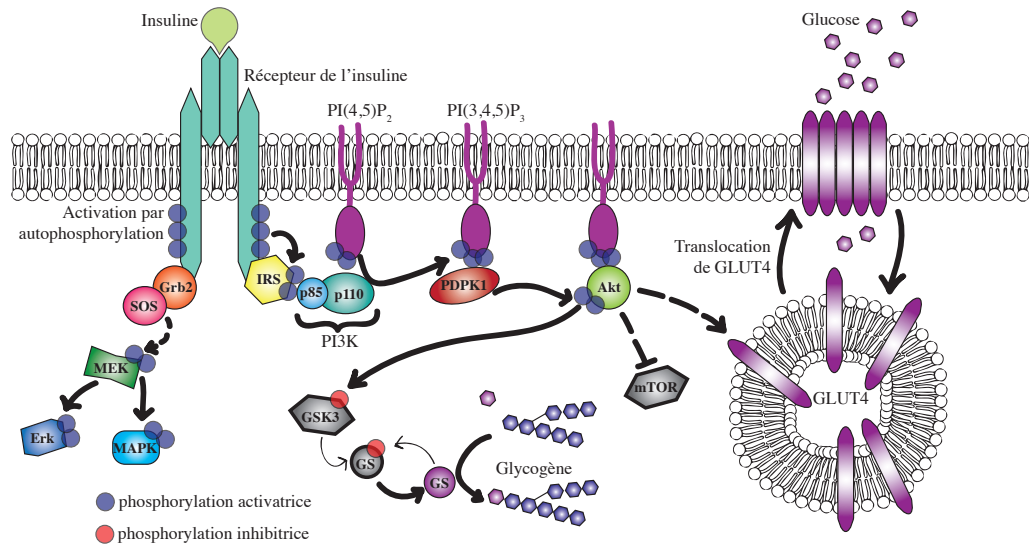
En 1892, Sir William Osler considérait le diabète comme étant une maladie rare aux États-Unis, comparativement à l'Europe, touchant à peine 2.8 personnes par tranche de 100 000 habitants (Osler, 1892). Désormais, la prévalence de cette maladie augmente mondialement de façon alarmante. En effet, le T2D est devenu endémique dans plusieurs pays

et affectera plus de 366 millions d'individus d'ici 2030 (Wild *et al.*, 2004; Olshansky *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2014). En fait, la constante croissance de la prévalence du diabète pourrait, d'après certaines prévisions, mettre fin aux gains de l'espérance de vie qui ont pris place au 20^e siècle (Olshansky *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2014). De nos jours, l'incidence augmente même chez les jeunes qui auparavant n'étaient jamais affectés par le T2D (Alberti *et al.*, 2004; Bloomgarden, 2004; Sebastião *et al.*, 2014)

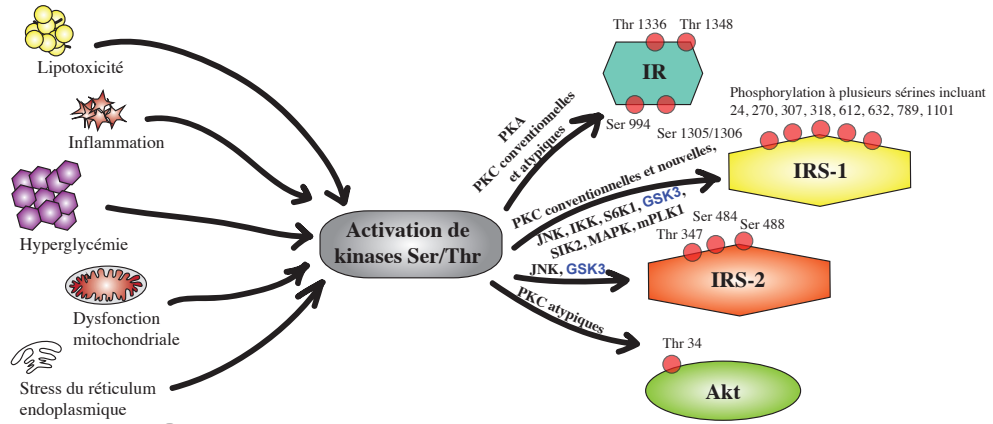
Signalisation de l'insuline et sa résistance dans le diabète

La signalisation de l'insuline commence lorsque celle-ci se lie à son récepteur (*Insulin receptor* – « IR »). Ensuite, l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur s'active pour mener à l'autophosphorylation de ses résidus tyrosines localisés à sa face cytoplasmique (De Meyts & Whittaker, 2002; Fröjdö *et al.*, 2009). Cette autophosphorylation active le récepteur qui peut alors recruter et phosphoryler une panoplie de molécules. Parmi celles-ci, les molécules IRS-1 et IRS-2 (de l'anglais *Insulin receptor substrate 1/2*) semblent être celles qui jouent un rôle majeur sur les kinases en aval de la cascade de l'insuline: PI3K/Akt (de l'anglais *Phosphoinositide 3 kinase*; Akt aussi connu sous le nom de protéine kinase B – « PKB ») et MAPK (de l'anglais *Mitogen-activated protein kinase*) (White, 2002; Fröjdö *et al.*, 2009) (Figure 8).

A



B



C

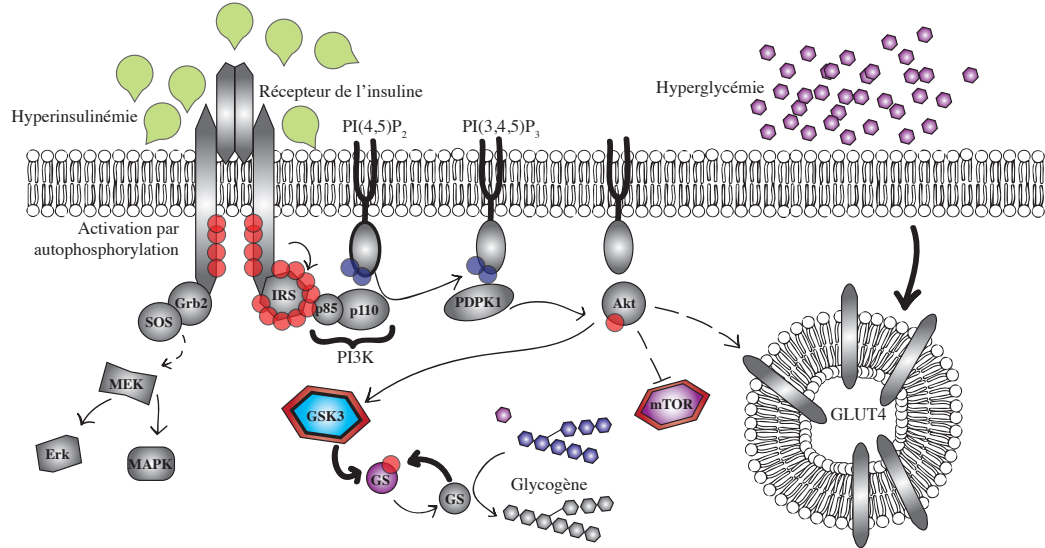


Figure 8. Signalisation de l'insuline et la résistance à l'insuline

(A) Signalisation simplifiée de l'insuline; Image produite par Sara Licea, inspirée de (Fröjdö *et al.*, 2009); (B) La lipotoxicité, l'inflammation, l'hyperglycémie, le stress oxydatif, les dysfonctions mitochondriales et le stress du réticulum endoplasmique convergent vers l'activation de kinases à sérines et thréonines. Ces kinases phosphorylent de façon pathologique l'IR, l'IRS-1/2 et l'Akt; numéro d'acide aminé de phosphorylation des sérines et thréonine de souris; Image produite par Sara Licea modifiée, de (Boucher *et al.*, 2014); (C) Signalisation simplifiée de la résistance à l'insuline; Image produite par Sara Licea inspirée de (Fröjdö *et al.*, 2009); « Akt » : aussi connue sous le nom de PKB – protéine kinase B, « Erk » : de l'anglais *Extracellular signal-regulated kinase*; « GLUT4 » : de l'anglais *Glucose transporter type 4*, « Grb2 » : de l'anglais *Growth factor receptor-bound protein 2*, « GS » : de l'anglais *Glycogen synthase*; « GSK3 » : de l'anglais *Glycogen synthase kinase 3*, « IKK » : de l'anglais *IκB kinase*, « IR » : de l'anglais *Insulin receptor*, « IRS » : de l'anglais *Insulin receptor substrate*, « JNK » : de l'anglais *c-Jun N-terminal kinase*, « MAPK » : de l'anglais *Mitogen-activated protein kinase*, « MEK » : aussi connue sous le nom de MKK – *Mitogen-activated protein kinase Kinase*, « mPLK1 » : de l'anglais *Mammalian polo-like kinase 1*; « mTOR » : de l'anglais *Mechanistic target of rapamycin*, « PDPK1 » : de l'anglais *3-Phosphoinositide dependent protein kinase 1*, « PI3K » : de l'anglais *Phosphoinositide 3-kinase*, « PI(4,5)P₂ » : Phosphaditylinositol-4,5-biphosphate, « PI(3,4,5)P₃ » : Phosphaditylinositol-3,4,5-triphosphate, « PKA » : de l'anglais *Protein kinase A*, « PKC » : de l'anglais *Protein kinase C*, « S6K1 » : de l'anglais *ribosomal protein S6 kinase*, « Ser » : Sérine, « SIK2 » : de l'anglais *Salt-induced kinase 2*, « SOS » : de l'anglais *Son-of-sevenless*, « Thr » : Thréonine.

Facteurs de risque du diabète de type II

Un des premiers facteurs de risque identifié pour le T2D est le vieillissement. Cependant, le développement du T2D est de plus en plus attribué au style de vie moderne. En effet, la prévalence du T2D serait grandement influencée par l'activité physique, la masse corporelle, la répartition corporelle des graisses et la diète (Fonseca & John-Kalarickal, 2010). Ces facteurs amènent la sédentarité, une tension artérielle élevée et le syndrome métabolique. Ce dernier est un amalgame de plusieurs troubles, incluant la dyslipidémie et l'obésité, qui augmentent les risques de maladies cardiovasculaires (Eckel *et al.*, 2005; Sims-Robinson *et al.*, 2010; Kim & Feldman, 2012; Sebastião *et al.*, 2014).

Entre 60% à 90% des cas de T2D apparaissent en raison de l'obésité, plus particulièrement l'adiposité abdominale (Anderson *et al.*, 2003; James, 2008; Fonseca & John-Kalarickal, 2010; Mirae-Nedjad, 2013). De plus, la durée de l'obésité a une très forte valeur prédictive du T2D (Fonseca & John-Kalarickal, 2010). Ce n'est que récemment qu'une explication semble faire surface. 80% des individus obèses souffrent de résistance à l'insuline (Cholerton *et al.*, 2011). La résistance à l'insuline est repérable avant même le développement d'hyperglycémie (Reaven, 1988; Evans *et al.*, 2002). De plus, des données probantes suggèrent que les acides gras libres (*Free fatty acid* – « FFA ») lient l'obésité à la résistance à l'insuline (Boden, 1997; Santomauro *et al.*, 1999; Shulman, 2000; Evans *et al.*, 2002). En effet, les FFA sont élevés dans le plasma des patients obèses (Boden, 1997). De plus, les FFA inhibent l'IDE (de l'anglais *Insulin degrading enzyme* – « IDE »), une enzyme essentielle à la signalisation normale de l'insuline (Cholerton *et al.*, 2011). L'insuline inhibe normalement l'action de la lipase d'adipocyte pour diminuer la libération de FFA des tissus adipeux. Avec l'obésité et la signalisation anormale de l'insuline, ce processus est perturbé menant à une élévation chronique des FFA (Eckel *et al.*, 2005; Cholerton *et al.*, 2011). Cette élévation chronique favorise par la suite la résistance à l'insuline (Boden, 1997) bouclant la boucle de rétroaction positive entre les FFA et la résistance à l'insuline.

Prévention ou retardement du diabète de type II

La prévention reste le meilleur traitement du T2D. Le prédiabète offre un avertissement des risques de développer le T2D puisque près de 50% des personnes atteintes de prédiabète développent le T2D (Canadian Diabetes Association, consulté le 13 juin 2016). Le prédiabète se définit comme une condition où les niveaux de glucose sanguin sont plus élevés que la normale, mais toujours en deçà du seuil diagnostique du T2D (Canadian Diabetes Association, consulté le 13 juin 2016). Si des mesures sont prises pour contrôler le glucose sanguin et modifier le style de vie, le T2D peut être retardé, voire prévenu. Ces changements incluent la perte de 5-10% de la masse corporelle totale, une alimentation saine et de l'activité physique régulière (Horton, 2010; Canadian Diabetes Association, consulté le 13 juin 2016).

Pathophysiologie commune à la maladie d'Alzheimer et au diabète de type II

Plusieurs anormalités sont communes à la maladie d'Alzheimer et au T2D incluant la perturbation du métabolisme du glucose, de l'apprentissage et de la mémoire spatiale sans compter la résistance à l'insuline, la neuroinflammation, l'amyloïdogénèse, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, l'augmentation du stress oxydatif ainsi que l'altération de la composition des protéines synaptiques (Janson *et al.*, 2004; De La Monte & Wands, 2008; De La Monte, 2009; Chen *et al.*, 2013). C'est pourquoi le terme « diabète de type 3 » ou bien « T2D spécifique au cerveau » est parfois estampé à la maladie d'Alzheimer (Steen *et al.*, 2005). Cette appellation supporte l'idée que les stratégies thérapeutiques soulageant le T2D pourraient aussi être bénéfiques contre la maladie d'Alzheimer (Sebastião *et al.*, 2014).

Deux maladies amyloïdogéniques

Bien que la maladie la plus reconnue pour ses conformations amyloïdogéniques soit la maladie d'Alzheimer, d'autres défaillances d'organes seraient causées par des protéines amyloïdogéniques. Les maladies de conformation de type amyloïde (amyloïdose) sont classifiées comme un groupe de désordres causés par le repliement anormal et l'agrégation de protéines dans une conformation qui ne leur est pas native (Hayden *et al.*, 2005). Diminuer l'amyloïde ou son précurseur offre des bénéfices thérapeutiques chez les patients (Bulawa *et al.*, 2012; Hård & Lendel, 2012; Uversky, 2012; Arosio *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2014; Selkoe & Hardy, 2016). Une cinquantaine d'amyloïdoses sont reconnues avec une multitude de symptômes associés au repliement de peptides solubles en agrégats (Knowles *et al.*, 2014). Dans la plupart des amyloïdoses, les protéines mal repliées se trouvent dans une structure secondaire nommée « feuillet plissé bêta ». Ces feuillets peuvent s'associer pour former un dépôt fibrillaire très stable connu sous le nom d'amyloïde (Knowles *et al.*, 2014).

Ces fibres sont identifiables par la coloration « *Congo Red* » et montrent une biréfringence lorsqu'observées avec des polariseurs croisés (Sipe *et al.*, 2010; Eisenberg & Jucker, 2012). Ce motif a été observé pour la toute première fois par le biophysicien William Astbury (Astbury *et al.*, 1935; Eisenberg & Jucker, 2012). En observant le blanc d'un oeuf poché, Astbury déduit que les fibres sont composées de fils allongés de protéines empilées le long de l'axe de la fibre formant ainsi des feuillets parallèles les uns aux autres. Près de 15 ans plus tard, Pauling et Corey ont construit le modèle des feuillets bêta montrant que des liens hydrogènes tiennent les fils en feuillets (Pauling & Corey, 1951; Eisenberg, 2003).

La plupart des formations d'amyloïdes chez les mammifères surviennent avec le vieillissement (Selkoe, 2003; Chiti & Dobson, 2006; Eisenberg & Jucker, 2012). Il est donc intéressant que la maladie d'Alzheimer et le T2D soient des amyloïdoses ayant tous deux un lien avec la perturbation de la signalisation de l'insuline. Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine amyloïde est l'A β provenant de l'APP alors que dans le T2D la protéine amyloïde est l'amylin ou l'IAPP (de l'anglais *Islet amyloid polypeptide*) provenant de la proIAPP (de l'anglais *Proislet amyloid polypeptide*) (Eisenberg & Jucker, 2012).

L'IAPP (*Islet amyloid polypeptide*) et A β (bêta-amyloïde)

La première description des dépôts amyloïdes dans les îlots pancréatiques, décrits alors comme matériel homogène d'hyaline (*Homogenous hyaline material*), remonte à 1901 par Opie (Opie, 1901). Cependant, l'IAPP n'a été isolé que deux ans après l'APP (Westermarck *et al.*, 1986). La formation des fibrilles d'IAPP serait déclenchée par diverses causes incluant la mutation du gène de l'IAPP, la surexpression de l'IAPP en condition d'obésité et une diète riche en gras (Marzban *et al.*, 2003). Les séquences des deux peptides ont beaucoup de similitudes (Figure 9A) (Petkova *et al.*, 2002; Oskarsson, 2015).

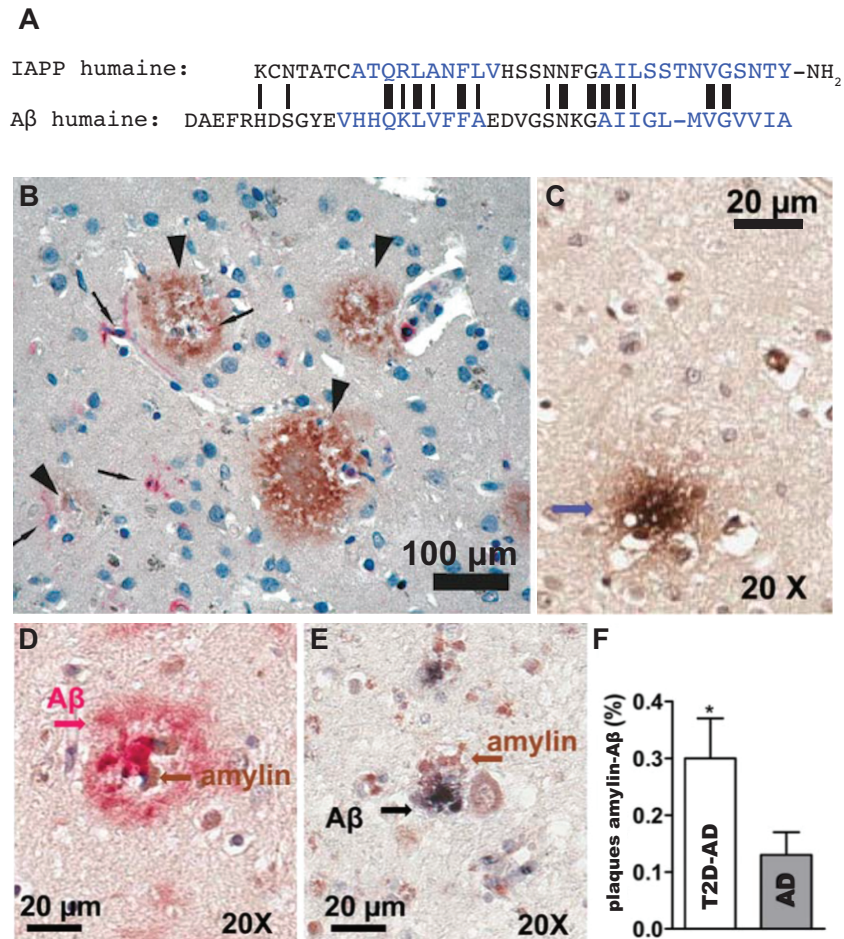


Figure 9. L'IAPP et l'Aβ

(A) Séquence humaine d'amylin (IAPP) et d'Aβ42. En bleu, les acides aminés impliqués dans la formation des feuillets bêta au coeur des fibrilles amyloïdes. Les lignes minces représentent les acides aminés similaires et les lignes épaisses les acides aminés identiques; Image produite par Sara Licea, modifiée de (Luca *et al.*, 2007; Oskarsson, 2015); (B – D) Dépôts d'amyloïdes dans le parenchyme d'un cerveau Alzheimer et (E) d'un cerveau T2D-Alzheimer. (B) Plaques séniles colorées en brun avec un anticorps anti-Aβ (indiquées avec des triangles) obtenues de la Fig.8-A de (Liu *et al.*, 2005); (C) Plaque d'amylin colorée en brun avec un anticorps anti-amylin obtenu de la Fig.2-D (Jackson *et al.*, 2013). (D – E) Amas de petites plaques d'amylin (en brun) adjacentes ou entourées par des dépôts d'Aβ (rouge en D et bleu en E); (F) Estimation de la fraction des plaques mixtes d'amylin et Aβ dans un champ visuel de 0.4 x 1 mm de groupe de patients diabétiques avec la maladie d'Alzheimer (T2D-AD) et d'Alzheimer sans diagnostic de diabète (AD) *p<0.05 obtenue de la Fig.4-D (Jackson *et al.*, 2013). Échelles indiquées sur les coupes histologiques « Aβ » : bêta-amyloïde, « AD » : patients Alzheimer sans diagnostic de diabète « IAPP » : de l'anglais *Islet amyloid polypeptide*, « T2D-AD » : patients diabétiques avec la maladie d'Alzheimer.

Janson et collègues (Janson *et al.*, 2004) rapportèrent que l'IAPP était plus présent chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer que chez les individus non déments. De plus, la charge en plaques amyloïdes (A β) chez les patients Alzheimer comorbides avec le T2D corrèle avec la durée du diabète (Janson *et al.*, 2004). D'autre part, la présence de dépôts immunoréactifs pour l'IAPP adjacents à des dépôts d'A β dans le parenchyme et les parois vasculaires de cerveaux Alzheimer ont été décrits par Jackson et collègues (Jackson *et al.*, 2013) (Figure 9B-F). L'immunocoloration double pour l'A β et l'IAPP a montré que les deux types d'amyloïdes colocalisent dans les îlots de Langerhans (Miklossy *et al.*, 2010).

De plus, le même mode d'induction de la pathologie des NFTs par d'autres protéines amyloïdogéniques semble exister suggérant une méthode d'induction générale de la formation des NFTs par des peptides amyloïdes (Ittner & Götz, 2011). Dans cet ordre d'idée, la protéine Tau hyperphosphorylée se retrouve également dans les îlots de Langerhans chez les patients atteints de T2D (Miklossy *et al.*, 2010). Ceci indique que la formation d'amyloïdes et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau sont des caractéristiques présentes dans le T2D également (Miklossy *et al.*, 2010).

Les protéoglycanes, en particulier les HSPGs (de l'anglais *Heparan sulfate proteoglycans*) sont constitutivement trouvés dans tous les types de dépôts amyloïdes indépendamment de la protéine précurseur ou du tissu affecté (Snow & Wight, 1989; Sipe & Cohen, 2000; Oskarsson, 2015). Le sulfate d'héparan (*Heparan sulfate* – HS) accélérerait la formation d'amyloïde en réponse à un mécanisme d'échafaudage qui lie plusieurs protéines amyloïdes en augmentant leur concentration locale ou encore en les alignant pour faciliter leur interaction (Motamedi-Shad *et al.*, 2009). Il a été suggéré que les HS pourraient également stabiliser la structure des feuillets bêta et prévenir la dissociation des fibrilles matures ainsi que leur dégradation (Gupta-Bansal *et al.*, 1995; Cohlberg *et al.*, 2002).

Finalement, l'A β , tout comme l'IAPP et l'insuline sont des substrats de l'IDE. En effet, ces substrats compétitionnent *in vivo* pour l'IDE (Bennett *et al.*, 2000b). Un déséquilibre de l'un des substrats pourrait influencer la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer et du T2D (Bennett *et al.*, 2000b; Qiu & Folstein, 2006).

Problèmes cognitifs chez les patients atteints de diabète de type II

Les effets néfastes du diabète sur les fonctions cognitives ont été décrits en premier lieu dans les années 20 (Miles & Root, 1922). Cependant, il y eut peu d'avancement sur ce sujet jusqu'à ce que Bale (Bale, 1973) publia la première étude moderne sur le diabète et la cognition (Nilsson, 2006a). Le T2D est maintenant associé à des perturbations de l'apprentissage et de la mémoire dans les études chez les animaux et chez les humains en raison des défauts de l'insuline (Greenwood & Winocur, 2001; Cholerton *et al.*, 2011).

En raison des effets complexes du diabète sur les organes, les effets de cette maladie sur le cerveau sont probablement multifactoriels (Nilsson, 2006a). Les changements anatomiques du cerveau avec le vieillissement normal ne sont pas énormes, mais tout de même mesurables. En effet, le cerveau en vieillissant subit une petite réduction de volume, plus visible au niveau des ventricules et l'élargissement des sulci du cortex. Ces changements ont lieu malgré l'absence de maladies neurodégénératives particulières (Earnest *et al.*, 1979; Good *et al.*, 2002; Nilsson, 2006a). Cependant, ces changements sont plus prononcés dans des cerveaux Alzheimer, mais également dans des cerveaux T2D (Convit *et al.*, 1997; Last *et al.*, 2007).

La résistance à l'insuline dans le T2D amène initialement une hyperinsulinémie. Alors qu'une augmentation aiguë des niveaux d'insuline périphérique augmente l'insuline dans le CSF, une hyperinsulinémie périphérique chronique (comme lors d'une résistance à l'insuline dans le T2D) perturbe l'absorption de l'insuline à la BBB. Ces événements culminent en des troubles d'apprentissage, des problèmes de mémoire et des déficits cognitifs (Salkovic-Petrisic & Hoyer, 2007; Erol, 2008; Sebastião *et al.*, 2014).

La résistance à l'insuline, un phénomène commun à la maladie d'Alzheimer et au diabète de type II

Hoyer et collègues furent le premier groupe à suggérer que la désensibilisation du IR joue un rôle dans la maladie d'Alzheimer (Frölich *et al.*, 1998; Hoyer, 1998; Hoyer, 2002; Hoyer, 2004; Cholerton *et al.*, 2011). Cette désensibilisation, autrement dit la résistance à l'insuline, est une caractéristique essentielle du T2D pour qu'il soit diagnostiqué 10 à 20 ans avant l'apparition d'hyperglycémie (Zhao & Townsend, 2009).

Il était initialement cru que le cerveau était insensible à l'insuline jusqu'à la découverte d'IR dans le cerveau (Havrankova *et al.*, 1978a; Havrankova *et al.*, 1978b; Potau *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2014). Non seulement le cerveau exprime les IR, mais ils ont une distribution particulière. Les densités les plus élevées ont été trouvées dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet et le plexus choroïdien de rongeurs (Havrankova *et al.*, 1978a; Hill *et al.*, 1986; Hopkins & Williams, 1997; Chen *et al.*, 2014; Chami *et al.*, 2016).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que la résistance à l'insuline augmente les risques de développement de la démence (Razay & Wilcock, 1994; Luchsinger *et al.*, 2004; Rönnekaa *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014). Ceci semble paradoxal à première vue en raison de l'association de l'hyperinsulinémie au T2D. En effet, la résistance à l'insuline chez les patients diabétiques a lieu suite à la baisse de l'habilité des IR à répondre à la stimulation par l'insuline (Le Roith & Zick, 2001; Zhao & Townsend, 2009). Dans ces conditions, les cellules bêta des îlots pancréatiques sécrètent de plus hauts niveaux d'insuline pour compenser le déclin de la fonction des IR, rendant l'hyperinsulinémie une caractéristique importante du T2D (Reaven *et al.*, 1989; Reaven *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 2002; Zhao & Townsend, 2009). Cependant, cette hyperinsulinémie mène à un déclin compensatoire de l'insuline dans le cerveau en raison de la diminution des transporteurs d'insuline à la BBB (Cholerton *et al.*, 2011; Moreira, 2012; Chami *et al.*, 2016). Les défauts de signalisation de l'insuline ont été observés dans les cerveaux Alzheimer grâce à des études pathologiques *post mortem* (Frölich *et al.*, 1998; Steen *et al.*, 2005; De La Monte, 2009; Freude *et al.*, 2009; Kahn & Suzuki, 2010; Bomfim *et al.*, 2012; Talbot *et al.*, 2012; Chami *et al.*, 2016). Entre autres, les niveaux d'IR

(Steen *et al.*, 2005) ainsi que d'IRS-1/2 (Steen *et al.*, 2005; Bomfim *et al.*, 2012) sont grandement diminués.

Ces résultats appuient la notion que l'hyperinsulinémie aiguë et chronique ont des effets opposés sur les substrats neuronaux de la mémoire. Toutefois ces anomalies chroniques de l'insuline seraient associées à l'initiation de la cascade de la pathologie de l'Alzheimer des années, voire des décennies, avant que les premiers symptômes cliniques de démence se manifestent (Cholerton *et al.*, 2011). La résistance à l'insuline par la suractivation de la GSK3 phosphoryle la protéine Tau (*infra* : Substrats de la GSK3) (Schubert *et al.*, 2004). La résistance à l'insuline pourrait également être un déclencheur ou un accélérateur de l'amyloïdose (Zhao & Townsend, 2009). En effet, les souris transgéniques ayant subi une diète menant à une résistance à l'insuline (*High Fat Diet* – « HFD ») montrent une augmentation des dépôts d'A β ainsi que des déficits de la mémoire (Ho *et al.*, 2004). Une des explications est qu'avec la perte de voies clés de la signalisation de l'insuline à travers la vie, le cerveau se trouve en situation de jeûne (Zhao & Townsend, 2009).

Ainsi, il a été proposé que la signalisation défectueuse de l'insuline dans les cerveaux Alzheimer contribuerait à l'agrégation et la déposition d'A β , à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, la promotion de la neuroinflammation et la perturbation de la plasticité synaptique menant à la détérioration de la mémoire et des facultés cognitives (Craft *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014).

Rôle de l'insuline dans le cerveau

L'insuline cérébrale joue un rôle sur le contrôle du poids par des régulations neuronales de l'hypothalamus (Woods *et al.*, 1979; McGowan *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2006). En effet, l'infusion d'insuline dans le système nerveux central supprime la production périphérique de glucose (Obici *et al.*, 2002), diminue la consommation de nourriture et la prise de poids (Woods *et al.*, 1979; McGowan *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2006). Cependant, la distribution concentrée des IR dans certaines aires (Havrankova *et al.*, 1978a) est également compatible avec un rôle primordial dans l'apprentissage et la mémoire (Zhao *et al.*, 2004b). En effet, les IR et les IRS sont très

concentrés, entre autres, à la densité post-synaptique dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet des rats (Abbott *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2014).

Les transporteurs GLUT1 et GLUT3 ont été les premiers à être identifiés dans le cerveau. GLUT1 est grandement exprimé dans les cellules endothéliales de la BBB et est responsable du transport du glucose sanguin à l'espace extracellulaire des neurones (Schubert, 2005). GLUT3 quant à lui est le transporteur neuronal majoritaire. Il participe au transport du glucose extracellulaire à l'intérieur des neurones (Dwyer *et al.*, 2002; Schubert, 2005; Chen *et al.*, 2014). Puisque GLUT1 et GLUT3 sont des récepteurs insensibles à l'insuline, le métabolisme du glucose cérébral a initialement été vu comme indépendant de l'insuline (Chen *et al.*, 2014). Cependant, de nouvelles données ont changé cette idée. Tout d'abord, l'expression de surface des transporteurs GLUT1 et GLUT3 semble être régulée dans le cerveau par la signalisation de l'insuline (Ferreira *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter qu'une diminution de GLUT1 et de GLUT3 est observée dans les cerveaux Alzheimer (Simpson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2008). De plus, les transporteurs GLUT4 sensibles à l'insuline, initialement pensés absents du cerveau, sont exprimés avec une distribution bien précise. En effet, ils sont exprimés aux régions impliquées dans la mémoire et la cognition comme l'hippocampe et le cortex temporal (Chen *et al.*, 2014). Puisque les IR sont également en grand nombre dans ces régions, il est fort probable que l'insuline joue un rôle sur la mémoire à travers l'absorption du glucose par les GLUT4.

De façon intéressante, la libération de l'insuline (Clarke *et al.*, 1986), la présence d'acide ribonucléique messager (*messenger ribonucleic acid* – « mRNA ») (Marks *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1997) ainsi que l'immunoréactivité à l'insuline (Raizada, 1983) ont été détectées dans des cultures de neurones suggérant la synthèse neuronale de l'insuline. Cette insuline ne serait produite que par un sous-groupe de neurones comme les neurones pyramidaux de l'hippocampe, du cortex préfrontal, du cortex entorhinal et du bulbe olfactif, mais non les cellules gliales (Chen *et al.*, 2014).

L'importance de l'insuline dans la santé cérébrale est maintenant reconnue puisqu'elle peut réguler la prolifération et la différenciation neuronale (Chen *et al.*, 2014), promouvoir le prolongement des neurites (Mill *et al.*, 1985), prévenir l'apoptose (Wu *et al.*, 2004; Anarkooli *et al.*, 2009) et protéger les neurones du stress oxydatif (Duarte *et al.*, 2006; Duarte *et al.*,

2008). De plus, la signalisation de l'insuline est associée à une régulation de la mémoire et de la cognition, la modulation de la phosphorylation de la protéine Tau, l'expression de l'APP, l'élimination de l'A β ainsi que le métabolisme du glucose cérébral (Chen *et al.*, 2014).

Si la résistance à l'insuline semble précipiter les caractéristiques neuropathologiques et comportementales de la maladie d'Alzheimer, l'augmentation de l'apport en insuline dans le cerveau devrait réduire les changements neuropathologiques liés à la maladie d'Alzheimer (Cholerton *et al.*, 2011).

Traitements d'insuline sur la mémoire des rongeurs

Plusieurs études sur des souris modèles de la maladie d'Alzheimer ont été faites et toutes montrent que l'utilisation d'un sensibilisateur à l'insuline diminue les niveaux d'A β 42 et améliore la mémoire (Pedersen *et al.*, 2006; Sims-Robinson *et al.*, 2010). La formation de mémoire à court et long terme induit une forte augmentation de l'expression des IR dans l'hippocampe (Zhao *et al.*, 1999). Conséquemment, les traitements intranasaux chroniques d'insuline améliorent la reconnaissance des objets à court et long terme chez les souris (Marks *et al.*, 2009). De plus, l'administration aiguë intracérébroventriculaire ainsi qu'intrahippocampale d'insuline chez les rats améliore la mémoire dans les tâches d'évitement passif (*Passive avoidance task*) (Park *et al.*, 2000; Babri *et al.*, 2007).

Traitements d'insuline sur la mémoire des patients Alzheimer

Puisque les traitements d'insuline semblent prometteurs, plusieurs essais cliniques ont eu lieu ou sont en cours. Entre autres, il a été montré que l'administration intraveineuse d'insuline en maintenant le glucose sanguin en euglycémie augmente le rappel narratif (*Story recall*) de façon fiable ainsi que la performance et l'attention (Craft *et al.*, 1996; Craft *et al.*, 1999; Kern *et al.*, 2001; Craft *et al.*, 2003; Yang & Song, 2013). L'administration intranasale d'insuline augmente également la mémoire autant chez des gens en santé que chez des gens souffrant de MCI ou d'Alzheimer (Reger *et al.*, 2006; Benedict *et al.*, 2011; Shemesh *et al.*, 2011; Craft *et al.*, 2012).

IDE (de l'anglais *Insulin degrading enzyme*)

De façon compatible avec l'hypothèse de la cascade amyloïde, plusieurs interactions entre l'A β et l'insuline ont été proposées pour lier le mécanisme de la résistance à l'insuline à la maladie d'Alzheimer; l'IDE est l'une d'elles. Comme mentionné précédemment, l'A β , l'insuline et l'IAPP sont tous les trois des substrats de l'IDE (Qiu & Folstein, 2006). En fait, l'IDE est l'une des principales voies de dégradation de l'A β (Chen *et al.*, 2014). De plus, des mutations de l'IDE induisent le T2D et perturbent la dégradation d'A β (Farris *et al.*, 2004).

Il y a maintenant plus de 65 ans, Mirsky et Broh-Kahn décrivirent ce qu'ils nommèrent une « insulinase » : une metalloendopeptidase de 100 kDa présente dans des extraits de foie (Mirsky & Broh-Kahn, 1948; Kahn & Suzuki, 2010). Cette enzyme, maintenant appelée IDE ou insulysin, est fortement exprimée dans le cerveau et les testicules et modérément dans les muscles et le foie (Kuo *et al.*, 1993; Kahn & Suzuki, 2010; Chen *et al.*, 2014). De plus, la région chromosomique du gène de l'IDE (10q) est liée génétiquement à la forme tardive de maladie d'Alzheimer (Bertram *et al.*, 2000) en plus d'être également liée génétiquement au T2D (Zeggini *et al.*, 2007).

L'IDE est surexprimée en présence d'insuline ce qui pourrait expliquer la relation entre la diminution de la signalisation de l'insuline qui est corrélée à une réduction de l'IDE dans les cerveaux Alzheimer (Zhao *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 2014; Chami *et al.*, 2016). En effet, l'incubation de neurones d'hippocampes en culture avec de l'insuline augmente l'expression de l'IDE, alors que la diminution de la sous-unité p85 de la PI3K est corrélée à une diminution de l'expression de l'IDE. Ceci a été observé dans les cerveaux de patients Alzheimer ainsi que dans les souris transgéniques Tg2576 nourries avec une HFD, une diète provoquant l'obésité et la résistance à l'insuline chez le rongeur (Zhao *et al.*, 2004a; Kahn & Suzuki, 2010). En raison de cette baisse d'IDE, ces souris se retrouvent avec des niveaux surélevés d'A β dans l'hippocampe et dans le cortex cérébral (Zhao *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 2014). Ainsi, une diminution de l'IDE causée par la signalisation insuffisante de l'insuline dans le cerveau pourrait accélérer l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Kahn & Suzuki, 2010). De plus, Fakhrai-Rad et collègues (Fakhrai-Rad *et al.*, 2000) ont proposé qu'une réduction de l'IDE

pourrait diminuer davantage la signalisation de l'insuline. En effet, la réduction de l'IDE diminuerait la dégradation de l'insuline qui est liée aux IR. Ces IR séquestrés et coincés avec l'insuline ne peuvent pas être recyclés à la membrane ayant pour résultat la diminution de la signalisation de l'insuline. Donc, lorsque les IDE ou les IR ont une activité défectueuse, la régulation mutuelle entre l'IDE et la signalisation de l'insuline dans le système nerveux central pourrait agir comme rétroaction positive déclenchant le développement des dysfonctions cognitives et l'apparition de la maladie d'Alzheimer chez les patients avec le T2D (Kahn & Suzuki, 2010).

Le diabète potentialise le facteur de risque ApoE4.

Comme mentionné plus tôt, l'ApoE est un régulateur crucial du métabolisme du cholestérol dans le cerveau. Être porteur de l'allèle ApoE4 est un grand facteur de risque pour développer la maladie d'Alzheimer (Polvikoski *et al.*, 1995; Selkoe & Hardy, 2016). De plus, le diabète exacerbe le risque d'Alzheimer associé à l'ApoE4 puisque les patients diabétiques portant l'allèle ApoE4 sont deux fois plus à risque de développer la maladie d'Alzheimer que les patients non-diabétiques porteurs de l'allèle (Peila *et al.*, 2002; Kahn & Suzuki, 2010; Sims-Robinson *et al.*, 2010; Yang & Song, 2013). De plus, l'hypercholérolémie est fortement associée au diabète et à la maladie d'Alzheimer (Harris, 1991; Yang & Song, 2013). En fait, l'hypercholérolémie est maintenant considérée comme un facteur de risque indépendant pour la maladie d'Alzheimer (Pappolla *et al.*, 2003; Canevari & Clark, 2007; Yang & Song, 2013).

La maladie d'Alzheimer et le diabète manifestent des défauts dans le métabolisme des lipides.

La dyslipidémie est fortement associée avec le diabète et la maladie d'Alzheimer (Mooradian, 2009; Yang & Song, 2013). Le métabolisme anormal des lipides, observé comme l'augmentation de l'accumulation de granules lipidiques dans les cerveaux Alzheimer, a été décrit comme faisant partie des cinq neuropathologies dans la publication d'Alzheimer lui-même (Alzheimer, 1907; Alzheimer *et al.*, 1987; Alzheimer *et al.*, 1995). Puisque l'insuline

régule plusieurs étapes du métabolisme des lipides, il est peu surprenant que le métabolisme des lipides soit anormal dans la maladie d'Alzheimer et le T2D (Hussain *et al.*, 2013; Vergès, 2015). En effet, tel qu'expliqué plus tôt, le blocage de la signalisation de l'insuline provoque la libération des FFA. Cette libération serait à la source de la dyslipidémie (Gadi & Samaha, 2007). Puisque les FFA inhibent également l'IDE, l'élimination de l'A β est perturbée (Cholerton *et al.*, 2011). De plus, le métabolisme des lipides aberrant favoriserait la dégénération dans la maladie d'Alzheimer (Hussain *et al.*, 2013) en augmentant la sécrétion et l'accumulation de l'A β (Amtul *et al.*, 2011). Les problèmes de métabolisme des lipides jettent la lumière sur le fait que la maladie d'Alzheimer est, tout comme le T2D, une maladie avec une composante métabolique importante.

La maladie d'Alzheimer, une neuropathologie métabolique

Alors que le cerveau ne représente que 2% de la masse totale du corps, celui-ci consomme 25% du glucose sanguin et utilise 20% de l'oxygène absorbé, dépassant largement la demande énergétique des autres organes (Magistretti, 2006; Zhao & Townsend, 2009; Magistretti & Allaman, 2013). Les autres tissus du corps utilisent une variété de sources d'énergie, mais le cerveau utilise principalement l'oxydation du glucose (Magistretti & Allaman, 2013). 80% de ce glucose est métabolisé pour produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour combler les besoins énergétiques de la neurotransmission (Sibson *et al.*, 1998; Magistretti *et al.*, 1999; Chami *et al.*, 2016). Ceci implique le maintien et le rétablissement des gradients ioniques associés à la transmission synaptique ainsi que l'absorption et le recyclage des neurotransmetteurs (Magistretti & Allaman, 2013). Avec l'âge, l'utilisation du glucose cérébral décline progressivement, mais ce déclin est beaucoup plus prononcé chez les individus atteints de la maladie d'Alzheimer. Ceci contribuerait fort probablement à la perte de cellules nerveuses et au déclin de la mémoire observés chez ces patients (Heiss *et al.*, 1991). En effet, la neuroimagerie montre qu'il y a un problème fondamental du métabolisme du glucose qui se note rapidement dans la pathologie Alzheimer (Cohen & Klunk, 2014; Chami *et al.*, 2016).

Redéfinir la maladie d'Alzheimer : une maladie métabolique menant à une neurodégénération

L'insuline est un régulateur maître du vieillissement corporel déterminant le rythme et l'expression du vieillissement dans toutes les espèces connues (Cholerton *et al.*, 2011). Par conséquent, il est suggéré que l'insuline joue un rôle important dans le vieillissement du cerveau et la perte cognitive associés avec la pathologie du cerveau vieillissant (Cholerton *et al.*, 2011). Pour ces raisons, la maladie d'Alzheimer est souvent caractérisée comme une maladie métabolique avec une signalisation de l'insuline perturbée menant à la neurodégénération (Chen *et al.*, 2014). En effet, plusieurs études ont montré que les anomalies du métabolisme du glucose cérébral prédisent la dégradation de patients sans symptômes ou de patients MCI à la maladie d'Alzheimer (Fukuyama *et al.*, 1994; Mosconi *et al.*, 2004; Anchisi *et al.*, 2005; Drzezga *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014; Cohen & Klunk, 2014). De plus, les patients Alzheimer qui ont une forte résistance à l'insuline ont une plus forte diminution de l'imagerie FDG-PET, l'un des 5 biomarqueurs décrits plus tôt dans l'établissement du diagnostic de la maladie d'Alzheimer, que la diminution observée chez les patients Alzheimer avec moins de résistance à l'insuline (Willette *et al.*, 2015).

De plus, la HFD induisant la résistance à l'insuline chez les souris transgéniques Tg2576 mène à un profil métabolique particulier. En effet, ces souris ont un taux d'insuline périphérique élevé alors qu'elles ont un bas taux d'insuline cérébrale avec une réduction des niveaux d'IDE comparés aux souris ayant une diète normale (Ho *et al.*, 2004; Cholerton *et al.*, 2011). Ainsi, la diète semble suffisante pour créer un dérèglement affectant la signalisation de l'insuline cérébrale et, par le fait même, le métabolisme du glucose. Cette dérégulation pourrait enclencher une cascade de rétroaction positive menant à la maladie d'Alzheimer puisque cette réduction d'IDE mène à une diminution de l'élimination d'A β . L'A β s'accumule, entre autres, dans le système vasculaire cérébral dans plus de 80% des cas de maladie d'Alzheimer causant une angiopathie cérébrale, une anomalie cérébrale qui avait été notée par Alzheimer lui-même (Alzheimer, 1907; Alzheimer *et al.*, 1987; Alzheimer *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1996; Chami *et al.*, 2016). Cette angiopathie bloque la circulation sanguine exacerbant le déficit métabolique (Ellis *et al.*, 1996; Chami *et al.*, 2016).

Le cerveau diabétique et le cerveau Alzheimer : des cerveaux en carence ou à jeun

Puisque le cerveau surpasse les demandes énergétiques des autres organes, il est pensé que, suite à des changements métaboliques pathologiques, le cerveau manque d'énergie, commence à s'autodigérer et le stress oxydatif augmente (Mamelak, 2012). En effet, le cerveau à jeun doit se tourner vers d'autres sources d'énergie comme la transformation des acides aminés de ses propres protéines en énergie, mais, vraisemblablement, le cerveau utilise d'abord le glutamate qui est en grande concentration dans ses terminaisons nerveuses (Erecińska *et al.*, 1988; Mamelak, 2012). Ce glutamate serait utilisé suite à sa conversion en α -ketoglutarate au détriment d'une baisse substantielle des concentrations synaptiques (Erecińska *et al.*, 1988; Mamelak, 2012). Ceci pourrait expliquer la carence progressive des niveaux de glutamate en réaction à la carence énergétique chez les patients MCI et plus fortement chez les patients AD (Fayed *et al.*, 2011). D'autres situations de carence semblent promouvoir la maladie d'Alzheimer. En effet, des études épidémiologiques ont montré que le jeûne et la malnutrition sont également des facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer (Abalan, 1984; Henderson, 1988; Mamelak, 2012). Or, lorsqu'on parle de T2D, il est important de comprendre que l'hyperinsulinémie chronique mène à une résistance à l'insuline dans le cerveau. Les cerveaux de patients atteints de T2D sont donc dans un état de carence ou de jeûne. Ce jeûne, autrement dit ce stress cellulaire, pourrait déclencher plusieurs voies pathologiques menant au développement des SAD.

Sun et collègues (Sun *et al.*, 2006a) étudièrent l'expression de la BACE1 dans des conditions d'hypoxie. En effet, ils trouvèrent que l'hypoxie augmente l'expression de la BACE1, les dépôts d'A β ainsi que les déficits de mémoire chez la souris transgénique APP23. Velliquette et collègues (Velliquette *et al.*, 2005) montrèrent que l'inhibition énergétique suffit pour augmenter l'expression de la BACE1, rendant la carence énergétique un facteur de risque supplémentaire de la maladie d'Alzheimer. C'est en utilisant un modèle *in vitro* de carence énergétique, c'est-à-dire en privant les cellules de glucose, qu'il a été montré que cette privation augmentait à la fois l'expression de la BACE1 au niveau post-transcriptionnel et la phosphorylation du facteur de transcription eIF2 α (O'Connor *et al.*, 2008). Ces résultats ont été

reproduits *in vivo* avec un paradigme de privation chronique d'énergie autant chez des souris sauvages que chez des souris modèles Tg2576 (O'Connor *et al.*, 2008). Ceci expliquerait probablement pourquoi l'inhibition du métabolisme du glucose semble augmenter le clivage de l'APP *in vitro* (Gabuzda *et al.*, 1994; Gasparini *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1998; Gasparini *et al.*, 1999).

Par la suite, Chen et collègues (Chen *et al.*, 2012a) montrèrent que les niveaux de la BACE1 et du NF- κ B (de l'anglais *Nuclear factor kappa B*) sont augmentés dans des patients atteints de SAD suggérant que le NF- κ B facilite l'expression génique de la BACE1. La phosphorylation d'eIF2 α est fondamentale pour l'activation du NF- κ B dans les signaux de stress cellulaire (Jiang *et al.*, 2003). De plus, il est intéressant de noter que des sous-unités du NF- κ B (p65 et p105) sont des substrats de la GSK3 (Demarchi *et al.*, 2003; Buss *et al.*, 2004; Viatour *et al.*, 2005) et donc que l'activité de la GSK3 influence l'activité transcriptionnelle du NF- κ B (Hoeflich *et al.*, 2000; Ghosh & Karin, 2002).

Implication de la GSK3 (de l'anglais *Glycogen synthase kinase 3*) : le pont entre les deux maladies?

Le développement de neurones induits à partir iPSC de patients ayant une maladie neurodégénérative complexe offre beaucoup de pistes autant thérapeutiques qu'au niveau de la recherche. En effet, cet outil « humanisé » offre, entre autres, les facilités qui viennent avec les études en cultures cellulaires en éliminant beaucoup de problèmes translationnels souvent rencontrés avec l'utilisation de souris modèles. La GSK3 a immédiatement été identifiée comme un facteur majeur différenciant les cellules dérivées de patients souffrant de FAD ainsi que de SAD des cellules dérivées de patients contrôles (Israel *et al.*, 2012). Pour l'instant, la raison expliquant pourquoi le diabète amène un risque de développer la maladie d'Alzheimer n'est pas connue, mais une relation linéaire simple impliquant la GSK3 est proposée. En effet, l'hyperinsulinémie associée au T2D mène à une diminution de signalisation de l'insuline dans le cerveau. Cette diminution de la voie PI3K/Akt réduit l'inhibition de la GSK3 (Chami *et al.*, 2016) (Figure 8). Ainsi, nous observons une activation aberrante de la GSK3 (Figure 10).

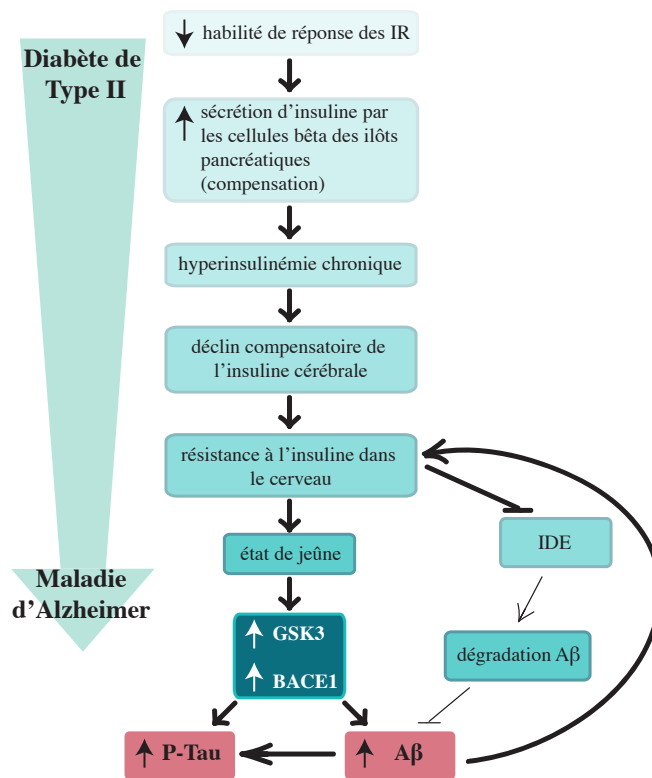


Figure 10. Relation expliquant potentiellement le lien entre le diabète de type II et la maladie d'Alzheimer

La baisse de l'habileté des IR à répondre à la stimulation par l'insuline mène à la sécrétion de plus hauts niveaux d'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques pour compenser pour le déclin de la fonction des IR. Cependant, cette hyperinsulinémie chronique mène à un déclin compensatoire de l'insuline dans le cerveau en raison de la diminution des transporteurs d'insuline à la BBB et perturbe l'absorption de l'insuline. Le cerveau se trouve alors dans un état de jeûne. Cet état mène à l'augmentation de l'activité de la GSK3 qui augmente l'expression de la BACE1. La GSK3 participe directement à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. À travers la BACE1 et, possiblement d'autres molécules, la GSK3 participe également à la production d'Aβ. Parallèlement, la résistance à l'insuline diminue l'expression de l'IDE, donc diminue la dégradation de l'Aβ. De plus, l'Aβ contribue également à la résistance à l'insuline formant une rétroaction positive. Finalement, suivant l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'Aβ participe à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (voir Figure 4); Image produite par Sara Licea, modifiée de (Aulston *et al.*, 2013); « Aβ » : beta-amyloïde; « BACE1 » : de l'anglais *Beta-site APP cleaving enzyme 1*; « BBB » : de l'anglais *Blood-brain barrier*; « IDE » : de l'anglais *Insulin degrading enzyme*; « IR » : de l'anglais *Insulin receptor*; « GSK3 » : de l'anglais *Glycogen synthase kinase 3*; « P-Tau » : hyperphosphorylation de la protéine Tau; « T2D » : de l'anglais *Type 2 diabetes*.

La GSK3 est une kinase à serine et thréonine qui a été identifiée il y a plus de 35 ans. Il était alors pensé que son rôle était exclusivement de réguler le métabolisme du glycogène (Embi *et al.*, 1980; Hemmings *et al.*, 1981). La phosphorylation de la glycogène synthase par la GSK3 inhibe la synthèse de glycogène à partir du glucose (Embi *et al.*, 1980; Eldar-Finkelman *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 2001) (Figure 8). La GSK3 est vouée à une énorme étendue de fonctions comme la régulation de la division cellulaire, de l'autorenouvellement des cellules souches (*Stem-cell renewal*), de l'apoptose, de la différenciation cellulaire, du rythme circadien et de la transcription (Chami *et al.*, 2016). La GSK3 a originalement été isolée des muscles squelettiques, mais elle est exprimée de façon ubiquitaire. Elle est particulièrement abondante dans le système nerveux central et encore plus dans l'hippocampe (Leroy & Brion, 1999; Maqbool *et al.*, 2016). Il existe 2 principaux isozymes de la GSK3 : la GSK3 α et la GSK3 β . Le poids moléculaire de la GSK3 α est de 51 kDa alors que celui de la GSK3 β est de 47 kDa. Les GSK3 sont en fait des paralogues issus de protéines homologues même si elles sont souvent référées comme « l'isoforme GSK3 α » et « l'isoforme GSK3 β » (Beurel *et al.*, 2015). Les paralogues α et β sont 98% similaires et la principale différence se trouve dans un tronçon riche en glycine dans la région N-terminale de la GSK3 α (Maqbool *et al.*, 2016).

Il est probable qu'il y ait un certain niveau sinon une complète redondance dans l'activité de ces deux paralogues puisque leur domaine catalytique est identique (Doble *et al.*, 2007; Chami *et al.*, 2016). Malheureusement, plusieurs études ont attribué leurs résultats obtenus à l'aide d'inhibiteurs spécifiques pour la GSK3 à un rôle de la GSK3 β menant à la conclusion erronée que la GSK3 β régule spécifiquement le processus étudié. Ces erreurs sont attribuables à la perception fautive que certains inhibiteurs sont spécifiques à la GSK3 β puisqu'une forme recombinante de la GSK3 β a été utilisée pour filtrer les inhibiteurs potentiels. Nous n'avons pas, à ce jour, réussi à trouver ou produire des inhibiteurs totalement spécifiques pour la GSK3 α ou la GSK3 β (Lo Monte *et al.*, 2012; Beurel *et al.*, 2015; Chami *et al.*, 2016). Cependant, les différents phénotypes de souris *knock-out* pour l'un ou l'autre des paralogues suggèrent des fonctions non redondantes des gènes de la GSK3 dans le cerveau alors que le chevauchement de problèmes comportementaux suggère des substrats communs (Medina & Avila, 2013).

Malgré que la GSK3 puisse phosphoryler quelques substrats sans phosphorylation préalable (*Non-primed substrates*), la majorité des cibles de la GSK3 ont une séquence S/T-X-X-X-S/T(P) où la GSK3 phosphoryle une sérine ou thréonine en amont d'une autre sérine ou thréonine préphosphorylée (Beurel *et al.*, 2015). Dans de rares cas, des substrats non phosphorylés, mais qui contiennent un résidu acide positionné quatre acides aminés en aval peuvent tout de même interagir avec le site de liaison de la GSK3 (Beurel *et al.*, 2015).

Régulation de l'activité de la GSK3

La GSK3 est active en conditions basales. Une phosphorylation sur un résidu sérine mène à une diminution de son activité. La Ser21 dans le cas de la GSK3 α et la Ser9 dans le cas de la GSK3 β cause cette inhibition en induisant un changement conformationnel (Sutherland *et al.*, 1993; Sutherland & Cohen, 1994; Cross *et al.*, 1995). La partie N-terminale de la protéine vient alors agir en tant que pseudo-substrat et se lie à elle-même dans son domaine de liaison entravant l'interaction avec d'autres substrats potentiels (Beurel *et al.*, 2015). Il existe également des tyrosines qui mènent à l'activation de la GSK3 (Abalan, 1984). Il est pensé que pendant la traduction de la protéine, alors qu'elle est immature, la GSK3 s'autophosphorylerait sur ses résidus menant à la synthèse d'une kinase immédiatement active (Cole *et al.*, 2004; Beurel *et al.*, 2015).

Les effets de l'inactivation de la GSK3 par l'insuline et l'IGF-1 (de l'anglais *Insulin-like growth factor 1*) sont les plus étudiés (Cross *et al.*, 1995). En effet, l'insuline et l'IGF-1 viennent activer leur récepteur respectif qui active la PI3K qui active par la suite l'Akt. L'Akt est la kinase à sérine et thréonine (Alessi *et al.*, 1996) qui phosphoryle la GSK3 pour inhiber son activité (Figure 8) (Sutherland *et al.*, 1993; Sutherland & Cohen, 1994; Cross *et al.*, 1995; Alessi *et al.*, 1996).

La GSK3 dans le diabète de type II

Les mécanismes menant à la résistance à l'insuline et au T2D sont multifactoriels, mais un des facteurs bien étudiés est le contrôle inadéquat de l'inhibition de la GSK3 (Eldar-

Finkelman, 2002; Jope & Johnson, 2004). En effet, l'activité aberrante de la GSK3 a été notée dans des cas d'obésité et de T2D (Eldar-Finkelman *et al.*, 1999; Ciaraldi *et al.*, 2002; Nikoulina *et al.*, 2002). L'augmentation de l'expression de la GSK3 dans les cellules musculaires de gens diabétiques (Eldar-Finkelman *et al.*, 1999; Nikoulina *et al.*, 2002; Maqbool *et al.*, 2016) cause une phosphorylation inhibitrice sur IRS-1/2 et la diminution des niveaux protéiques d'IRS-1/2 (Eldar-Finkelman & Krebs, 1997; Liberman & Eldar-Finkelman, 2005; Sharfi & Eldar-Finkelman, 2008). Ceci réduit donc la signalisation de l'insuline exacerbant ainsi la suractivation de la GSK3. C'est pourquoi la GSK3 est considérée comme étant une molécule importante dans le développement du T2D.

Rôles potentiels de la GSK3 dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer

La GSK3 peut réguler la transcription de la BACE1 (de l'anglais *Beta-site APP cleaving enzyme 1*).

Tel que mentionné plus tôt, la privation en énergie augmente l'expression de la BACE1 (Velliquette *et al.*, 2005). En raison de ces résultats ainsi que de ceux d'O'Connor et collègues (O'Connor *et al.*, 2008), Ly et collègues (Ly *et al.*, 2013) voulurent étudier le rôle de la GSK3 dans ces situations. En utilisant un inhibiteur spécifique de la GSK3, ils réussirent à réduire le clivage fait par la BACE1. En effet, ils observèrent une diminution de plaques séniles et une amélioration des problèmes de mémoire chez un modèle de souris Alzheimer. De plus, suivant les traces de Chen et collègues (Chen *et al.*, 2012a), ils montrèrent que la GSK3 régule la transcription de la BACE1 via la signalisation du NF- κ B. Il semblerait que l'effet passe par la GSK3 β puisque l'augmentation de l'expression de la BACE1 était perdue avec l'utilisation de petits ARN interférents (*small interfering RNA* – « siRNA ») pour la GSK3 β , mais non pas avec des siRNA pour la GSK3 α . Ainsi, Ly et collègues (Ly *et al.*, 2013) suggérèrent que l'inhibition de la GSK3 pourrait être une approche thérapeutique de traitement de la maladie d'Alzheimer.

La GSK3 participe dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.

En cherchant des kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, Ishiguro et collègues (Ishiguro *et al.*, 1988) identifièrent la TPKI. Ils trouvèrent ensuite qu'elle était identique à la GSK3 (Ishiguro *et al.*, 1993). Il semble que la GSK3 phosphoryle la protéine Tau à au moins 13 sites (Figure 5) (Yang *et al.*, 1993; Lovestone *et al.*, 1994; Sperbera *et al.*, 1995; Cho & Johnson, 2004; Beurel *et al.*, 2015; Maqbool *et al.*, 2016). Ainsi, la GSK3, anormalement active dans la maladie d'Alzheimer, vient hyperphosphoryler la protéine Tau menant à son détachement des microtubules, à son accumulation, à l'apparition de paires de filaments hélicoïdaux puis finalement à l'apparition de NFTs (Figure 5) (Hanger *et al.*, 1992; Lovestone *et al.*, 1994; Sperbera *et al.*, 1995; Maqbool *et al.*, 2016).

De plus, une interaction a récemment été trouvée entre l'A β 42 et la GSK3 α . Celle-ci augmenterait l'activité de la GSK3 α en terme de phosphorylation de la protéine Tau par un facteur de trois (Dunning *et al.*, 2015). Alors qu'il était pensé que la GSK3 β était le seul paralogue phosphorylant la protéine Tau, il semble que la GSK3 α aurait également un rôle à jouer dans cette phosphorylation sous certaines conditions.

La GSK3 peut phosphoryler l'APP (précurseur de la protéine amyloïde).

L'APP est aussi un substrat de la GSK3. En effet, il semble que la phosphorylation de la Thr668 soit faite entre autres par la GSK3 (Aplin *et al.*, 1996; Pierrot *et al.*, 2006; Rockenstein *et al.*, 2007). Celle-ci favoriserait l'association entre l'APP et la BACE1 renforçant le clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique (Lee *et al.*, 2003). Encore une fois, ceci créerait une rétroaction positive puisque l'A β semble également être en mesure de favoriser l'activation de la GSK3 en réduisant sa phosphorylation sur ses sérines inhibitrices (Cedazo-Mínguez *et al.*, 2003). Ainsi, l'accumulation d'A β activerait la GSK3 et cette dernière favoriserait l'interaction de l'APP avec la BACE1 produisant plus d'A β . De plus, Takashima et collègues (Takashima *et al.*, 1998) furent les premiers à montrer que l'inhibition de la GSK3 protégeait contre la mort cellulaire induite par l'A β (Takashima *et al.*, 1998).

La GSK3 peut phosphoryler la préséniline.

Un troisième substrat de la GSK3, prenant de l'importance dans la recherche sur la maladie d'Alzheimer, est la PS. En effet, il semble que la PS1 soit une cible de la GSK3 pour ses sérines 353/357 et 397/401 (Kirschenbaum *et al.*, 2001a; Twomey & McCarthy, 2006). De plus, Phiel et collègues (Phiel *et al.*, 2003) montrèrent que l'utilisation d'inhibiteurs de la GSK3 réduit les niveaux d'A β et que, puisqu'il y avait une accumulation de fragments C-terminal de l'APP (CTF), l'action de la GSK3 affecterait la γ -secrétase. Par l'utilisation de siRNA, ils montrèrent que la GSK3 α est impliquée dans ce processus. Un autre groupe montra également que l'inhibition de la GSK3 résultait en une diminution de l'activité de la γ -secrétase et prévenait la formation de plaques amyloïdes (Qing *et al.*, 2008). Finalement, Hurtado et collègues (Hurtado *et al.*, 2012) montrèrent le que *knockdown* spécifique de la GSK3 α diminue la formation de plaques amyloïdes. Il semble donc que la GSK3 soit un modulateur possible de la γ -secrétase (Maqbool *et al.*, 2016) en plus d'augmenter l'expression de la BACE1 (Ly *et al.*, 2013).

Hypothèse de recherche et objectifs

Problème : La maladie d'Alzheimer est majoritairement sporadique et n'a pas à ce jour de cause directe et précise. Cependant, la carence énergétique et la résistance à l'insuline semblent influencer son développement. Bien qu'un lien direct ait été établi entre la résistance à l'insuline et la phosphorylation de la protéine Tau via la suractivation de la GSK3, l'équivalent pour le clivage de l'APP n'est pas encore aussi bien établi. Il est important d'élucider le rôle que pourraient avoir ces carences sur la protéolyse de l'APP, puisque l'APP semble être le déclencheur de la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi nous avons voulu étudier le rôle de la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline sur le clivage de l'APP. De plus, puisque le cerveau Alzheimer est caractérisé comme un cerveau à jeun, nous avons voulu étudier le rôle du jeûne aigu sur le clivage de l'APP et si le jeûne peut sensibiliser à la perturbation de la signalisation de l'insuline. Les études faites sur la signalisation de l'insuline n'étudient généralement pas le lien direct moléculaire, mais plutôt l'effet de la perturbation chronique sur l'accumulation des produits de clivage de l'APP. À notre connaissance, la

combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline dans des cellules n'ayant pas d'APP surexprimé ou mutant n'a pas été étudiée. Tout porte à croire que ces situations pourraient favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer sporadique.

Hypothèse : Nous croyons que la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline peut influencer le clivage de l'APP. Nous pensons que ces effets sont observables dans des modèles sans mutation Alzheimer. Nous proposons également que les situations de carences énergétiques sensibilisent les cellules et les rendent plus vulnérables à des défauts de signalisation de l'insuline. Nous suggérons que cette vulnérabilité pourrait favoriser le clivage de l'APP.

Objectifs :

1. Établir l'effet du blocage de la signalisation de l'insuline sur le clivage de l'APP
2. Établir l'effet d'une carence énergétique
3. Établir la voie de clivage, s'il y a lieu
4. Établir l'effet de différentes mutations d'APP sur le clivage, s'il y a lieu
5. Vérifier les résultats, s'il y a lieu, dans un modèle neuronal

Chapitre 2 : Article^{*}

^{*} Hereinafter, we will refer to this chapter as “the Article” (« *l’Article* »)

Impairment of insulin receptor signalling increases the amyloidogenic processing of the amyloid-precursor protein.

Sara Licea and Jannic Boehm*

Département Neurosciences, Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central,
Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

*Correspondence: Jannic Boehm, Département Neurosciences, Université de Montréal,
2960 Chemin de la Tour, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

Tel :514 343 6370

E-mail: jannic.boehm@umontreal.ca

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. Several risk factors for AD have been identified, one of which is Type 2 Diabetes (T2D). T2D is characterized by an impairment of insulin receptor (IR) activation. However, how this impairment affects the development of AD remains largely elusive. One hallmark of AD is the production of amyloid beta ($A\beta$) through the sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by β -secretase and γ -secretase (the so-called amyloidoigenic pathway). To analyse how IR impairment contributes to the development of AD, we perturbed IR signalling with the IR inhibitor Tyrphostin AG-1024. We find that IR impairment leads to an increase in APP cleavage, which is dependent on the activation of β -secretase and γ -secretase. The alternative APP processing pathway that does not produce $A\beta$ production and involves α -secretase activity is not affected by IR impairment. Finally we show that the activation of GSK3 after IR impairment plays a critical role in the enhanced processing of APP. Taken together, our results suggest that the impairment of IR signalling seen in T2D increases the processing of APP via the amyloidoigenic pathway and thereby contributes to the pathology of AD.

Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia in the elderly, is characterized in its beginning by impaired memory formation and leading to an eventual general loss of higher cognitive function ¹. The two classic pathological characteristics of AD are neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau protein and amyloid plaques composed of aggregated amyloid-beta ($A\beta$) peptides. Genetic studies of familial AD in humans as well as studies on AD mouse models have identified the production of $A\beta$ as a strong contributing factor to AD ². $A\beta$ is the product of the sequential proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase ³.

Familial AD, i.e. the inherited predisposition to develop AD at a younger age due to mutations in APP, Presenilins (PS1/2) etc., accounts, however, for less than 5% of all AD cases, while the remaining 95% of AD patients represent the so-called sporadic cases ⁴. Over the last decade, several risk factors, like carrying the APOE-epsilon 4 allelic form of APOE, have been described to increase the occurrence of AD ⁵. Furthermore, certain diseases like Type 2 diabetes (T2D) were identified as risk factors for the development of AD ^{6,7}. Interestingly, the insulin-dependent signalling cascade is perturbed in brains of AD patients, suggesting that AD and T2D could share common underlying disease mechanisms ^{8,9}. Consequently, it was shown that the expression of $A\beta$ is enhanced in Tg2576 transgenic mice (an AD mouse model that leads to increased $A\beta$ production) when the mice were subjected to a diet that causes T2D insulin resistance ¹⁰. The increase in $A\beta$ in the context of type 2 diabetes remains largely unknown. Two different hypotheses are currently discussed. First, the insulin receptor (IR) impairment leads directly to an increase in APP cleavage and $A\beta$ production. Second, the decrease in IR signalling leads to a decrease in the expression of the insulin degrading enzyme, which is responsible for $A\beta$ clearance. That is to say that the increase in $A\beta$ is not due to an enhanced production, but to a decrease in $A\beta$ degradation ^{6,11}.

Taken together, several animal models support the hypothesis of increased $A\beta$ production in a context of IR signalling impairment. However, the underlying mechanism remains largely elusive.

To analyse whether IR signalling would affect APP processing, we created a luciferase based readout system to monitor APP processing in HEK293 cells. We find

that the acute inhibition of IR signalling by the IR inhibitor Tyrphostin leads to increased APP processing. Interestingly, the sensitivity to IR perturbations is greatly enhanced after a short period of starvation. We find that the increase in APP processing after IR signalling disruption is dependent on GSK3 activation and involves β - and γ -secretase activity. Our results therefore suggest that the disruption of IR signalling leads to enhanced APP processing.

Materials and methods

Plasmids

We altered the CheckMate mammalian two-hybrid system approach (Promega) to fuse the full-length GAL4 transcription factor via a linker peptide (10 glycine residues) to the C-terminal domain of APP (APP-GAL4) and cloned this construct into the pBIND plasmid, a CMV driven mammalian expression vector. We used the same approach for AICD-GAL4. pG5luc and the positive controls, pBIND-Id and pACT-MyoD plasmids, are from Promega and are part of the CheckMate system. pCI-GFP consists of eGFP cloned into the mammalian expression vector pCI and was used as a transfection control in APP-GAL4/pCI-GFP transfected HEK293 cells.

Cell Culture

HEK293 cells were maintained in α MEM supplemented with 10% fetal bovine serum FBS (Invitrogen). The cells were plated in 6-well culture dishes and transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. After 24 hrs, cells were starved overnight, when mentioned in the figure, by exchanging the media for a media with reduced FBS content (0.5% unless otherwise indicated) and the next day, incubated for 3 hrs with Tyrphostin AG-1024. Following Tyrphostin treatment, cell lysates were prepared for either Western blot analysis or Luciferase assays. For Western blots, cells were washed twice with ice-cold 1X-PBS and homogenized in a lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate, containing freshly prepared 1X protease inhibitors – Calbiochem – and 1X phosphatase inhibitors – Thermo Scientific).

For luciferase assays, cells were washed twice with 1X-PBS and homogenized with a passive lysis buffer included in the Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System, according to the manufacturer's instructions.

Luciferase Assays

For luciferase assays, each sample was measured in triplicate. In all measurements, the Firefly luminescence was normalized with the Renilla luminescence. Firefly and Renilla luminescence were sequentially measured by mixing the cell lysates with LAR and Stop&Glo reagents (included in the Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System) according to the manufacturer's instructions. Measurements were performed with a TECAN plate reader.

Western Blotting

Cell lysates were loaded onto a 10% SDS-PAGE, the proteins separated and then transferred onto Immobilon-P transfer membranes (Millipore). The following antibodies were used: α -APP N-terminus (Millipore), α -GFP (Invitrogen), α -P-GSK3 (Cell Signalling), α -GSK3 (Santa Cruz) and actin (monoclonal anti- β -actin, Sigma). Blots were developed using ECL (GE Healthcare). Results were quantified with the ImageJ software and were normalized to their respective controls (as indicated in the figure legends).

Drugs

Drugs were usually applied to the media either overnight or an hour prior to Tyrphostin AG-1024 (Alexis BioChemicals) treatment (unless otherwise specified), which lasted for 3 hrs (unless otherwise specified) followed by collecting the cell lysates for luciferase assay or a Western blot. For various experiments, we employed HMNPA(AM)₃ (Enzo Life Sciences Inc.), Picropodophyllotoxin (Sigma), Batimastat (Tocris Bioscience), Beta-secretase inhibitor IV (Millipore) LY411575 (Sigma), LY294002 (InvivoGen), Rapamycin (Selleckchem) and SB415286 (Selleckchem) at the concentrations indicated in the text or the figure legend.

Results

To analyze the involvement of insulin dependent signalling in APP processing we made use of the IR/IGF-1 receptor (IGF-1R) inhibitor Tyrphostin AG-1024. HEK293 cells were transfected with APP and incubated for 3 hours with 2 μ M and 26 μ M Tyrphostin. Western blot analysis revealed that the treatment with 26 μ M Tyrphostin leads to a significant increase in APP cleavage (Fig. 1A), while 2 μ M Tyrphostin had no effect. We next wanted to test whether starving cells would increase their susceptibility to IR perturbations. We therefore starved HEK 293 cells overnight and repeated the treatment with 2 μ M Tyrphostin for 3 hours. As shown in figure 1B, the treatment with 2 μ M Tyrphostin following starvation lead to an increase of APP cleavage, indicating that starvation strongly increases the susceptibility of IR to small perturbations.

Having established that Tyrphostin treatment in combination with starvation increases APP cleavage, we wanted to analyze the underlying signalling pathway. To achieve this goal, we developed a Luciferase based readout system inspired by the one earlier described by Zhang et al.¹², which allowed us to monitor the occurrence of APP cleavage more efficiently than by Western blot analysis. We altered the CheckMate mammalian two-hybrid system approach (Promega) in such a way that we fused the GAL4 transcription factor via a linker peptide (10 glycine residues) to the intracellular domain of APP (APP-GAL4, Figure 2A) and cloned this construct into the pBIND plasmid (a CMV driven mammalian expression vector). The assay is based on the fact that APP processing at the membrane will release the APP intracellular domain, which is fused to GAL4 (AICD-GAL4). AICD-GAL4 is then able to translocate to the nucleus where it induces GAL4-UAS driven Firefly-Luciferase expression from a co-transfected reporter plasmid (pG5luc vector). An increase in Firefly-Luciferase activity is therefore an indication of the increased APP processing. Our system exceeds previous approaches in allowing us to monitor and correct for differences in transfection efficiency through the additional measurement of Renilla-Luciferase activity. The Renilla-Luciferase gene is located on the pBIND plasmid under the control of a constitutively active SV40 promoter.

To test our Luciferase readout system, we first reproduced our results with Tyrphostin on APP cleavage, by transfecting HEK293 cells with pBIND-APP-GAL4 and

the reporter plasmid pG5luc. Like with our Western blot readout in figure 1, we observe an increase in APP processing, i.e. an increase in Luciferase activity, after a 3-hour treatment with 26 μ M Tyrphostin (Fig. 2B). Furthermore, as before, we observe that starving the cells for 16-18 hours leads to an increase in APP processing, i.e. increase in Luciferase expression, with 2 μ M Tyrphostin (Fig. 2C). Although having reproduced our former results, we wanted to assure ourselves that the combined starvation and Tyrphostin dependent increase in Luciferase activity is not a result of a general increase in transcriptional activity. That is to say that Tyrphostin treatment would affect our readout by increasing Luciferase expression independent of APP cleavage and release of the AICD-GAL4. To exclude this possibility, we transfected cells with two control plasmids from the mammalian two-hybrid system, which normally serve as positive controls (pBIND-Id and pACT-MyoD, Promega). The induction of Luciferase in pBIND-Id and pACT-MyoD expressing cells is only dependent on the interaction of MyoD with the Id-domain, allowing us to monitor whether Tyrphostin leads to an unspecific increase in Luciferase expression. As shown in figure 2D, Tyrphostin had no effect on Luciferase counts in cells expressing pBIND-Id and pACT-MyoD, suggesting that Tyrphostin does not generally affect Luciferase expression or activity. Then, we wanted to test whether the Tyrphostin dependent increase in Luciferase activity in APP-GAL4 expressing cells is indeed based on an increase in APP cleavage. We therefore cloned AICD-GAL4 into the pBIND expression vector. AICD-GAL4 is the end product of the processing of APP-GAL4 and is, as such, no longer dependent on any Tyrphostin induced cleavage. As expected, Tyrphostin treatment after starving the cells does not increase the Luciferase expression in cells transfected with AICD-GAL4 (Fig. 2E), indicating that the increase of Luciferase activity after Tyrphostin treatment in APP-GAL4 expressing cells is indeed dependent on APP cleavage. Taken together, we successfully established a refined Luciferase based assay to monitor APP processing.

After having established a faster readout system for APP cleavage, we turned our attention to the involved membrane receptor. Tyrphostin AG-1024 blocks IR activity, as well as IGF-1R activity. To analyze which of these two receptors is involved in APP cleavage we used the IGF-1R specific inhibitor Picropodophyllin (PPP) and another IR tyrosine kinase inhibitor HNMPA(AM)₃. We again starved APP-GAL4 expressing cells

overnight, followed by a 3-hour treatment with either Tyrphostin or HNMPA(AM)₃. We observe a significant increase in Luciferase activity with both treatments. However, the increase with Tyrphostin was more pronounced than with HNMPA(AM)₃ indicating that the combined inhibition of both receptors appears to have a stronger effect on APP cleavage than the inhibition of IR alone (Fig. 3A). Next, we analyzed the contribution of the IGF-1R to APP cleavage. We treated starved cells with Tyrphostin or PPP or both together. To our surprise, we observe no increase in Luciferase activity with PPP, suggesting that the IGF-1R blockade does not increase APP cleavage (Fig. 3B). However, we observe an increase in Luciferase activity in the combined treatment of Tyrphostin and PPP compared to Tyrphostin alone. This result indicates that although the blockade of IGF-1R signalling on its own does not increase APP cleavage, inhibiting IGF-1R signalling increases the effect of IR perturbations on APP processing, thereby suggesting crosstalk between IGF-1R and IR signalling cascades.

Next, we wanted to analyze whether starvation by itself affects APP cleavage. We incubated APP-GAL4 expressing HEK293 cells overnight with decreasing amounts of FBS, ranging from 10% to 0% FBS. We observed no increase in Luciferase activity with different FBS concentrations in the culture medium (Fig. 3C). Hence, starvation alone is insufficient to increase APP cleavage, but it is necessary to make the cell more susceptible to perturbations in insulin-dependent signalling pathways (see Fig. 1B and Fig 2C). To test the increase in susceptibility of APP cleavage with starving, we analyzed Tyrphostin induced APP cleavage under different starving conditions, ranging again from 10% to 0% FBS. We observe no or only minute effects on APP cleavage with 10% to 1 % FBS (Fig. 3D). Further reduction in FBS concentration leads to a continuous increase in Luciferase activity, i.e. a continuous increase in APP cleavage (Fig. 3D). Next, we established a time line for the effect of Tyrphostin on APP cleavage. We starved cells overnight and subjected the cells to different Tyrphostin incubation times. We observed no induction of APP cleavage, i.e. Luciferase activity after 10 min of Tyrphostin treatment. Starting at 30 min Luciferase activity is slightly elevated and is then continuously increasing with longer incubation times of Tyrphostin (Fig. 3E).

Having established that Tyrphostin combined with starvation leads to a time-dependent increase in APP cleavage and that this effect is mainly mediated through an

impairment in IR signalling, we turned our attention to the secretases involved in APP cleavage. We first analyzed whether the processing of APP is affected by changes in α -secretase activity. APP-GAL4 expressing cells were incubated with the α -secretase inhibitor Batimastat for 48 hours, i.e. from the time of transfection until Tyrphostin treatment. We observed no effect of Batimastat on Tyrphostin dependent increases in Luciferase activity indicating that α -secretase activity is not responsible for the Tyrphostin mediated increase in APP processing (Fig. 4A).

Next, we addressed the role of β -secretase by using β -secretase inhibitor IV. We incubated APP-GAL4 expressing cells with β -secretase inhibitor IV for 48 hours like Batimastat, from the time of transfection to Tyrphostin treatment. Contrary to the inhibition α -secretase activity, we observed a significant reduction in the Tyrphostin induced Luciferase activity with β -secretase inhibitor IV, indicating that Tyrphostin treatment increases β -secretase dependent APP processing (Fig. 4B). Finally, as a control, we tested the obligatory involvement of γ -secretase with the γ -secretase specific inhibitor LY411575. Following the same incubation protocol like before, we observe a strong reduction in Luciferase activity after treatment with LY411575 in control as well as Tyrphostin treated cells. This result was expected, since the expression of Luciferase is dependent on the γ -secretase mediated release of the AICD-GAL4. Taken together, our results suggest that the impairment of insulin signalling through the IR signalling cascade leads to an increase in β -secretase and γ -secretase dependent cleavage of APP.

Next, we wanted to analyze which components of the IR pathway play a role in increasing APP cleavage. To distinguish the effects that occur during the starving period from those that are induced by Tyrphostin, we treated cells with inhibitors for either the complete duration of the starving period and the Tyrphostin treatment or only 1-2 hours prior to Tyrphostin treatment. Since it is the first key molecule in the IR cascade, we tested the involvement of PI3K. To block PI3K activity, we used the specific PI3K inhibitor LY494002. Incubating cells with PI3K inhibitor LY494002 throughout the starvation period completely blocked the increase in Luciferase activity following Tyrphostin treatment (Fig. 5A). Contrary to this result, we observed no effect of LY494002 on Tyrphostin induced Luciferase activity when incubating APP-GAL4 expressing cells with LY494002 for only 1 hour prior to Tyrphostin treatment (Fig. 5B).

We obtained the same result, i.e. a blockage of Luciferase activity with overnight treatment and no effect with a treatment starting 1 hour prior to Tyrphostin application, with the alternative PI3K inhibitor Wortmannin (data not shown). These results indicate that PI3K activity during the starvation period is a necessary prerequisite for the increased susceptibility to subsequent perturbations in insulin signalling, but has no effect on Tyrphostin mediated increases in APP cleavage.

PI3K is upstream of AKT in the IR signalling pathway, which then regulates mTOR as well as GSK3 dependent signalling. We first tested the involvement of the mTOR pathway, by using the mTOR inhibitor rapamycin. We observed no reduction in Tyrphostin mediated Luciferase activity in APP-GAL4 expressing cells with incubation of rapamycin throughout the starvation period (Fig. 5D) or with a treatment starting 2 hours prior to Tyrphostin application (data not shown), indicating that the increase in APP cleavage caused by a deregulation of the insulin signalling pathway does not involve mTOR dependent signal transduction.

Given that blocking the mTOR pathway did not show any effect on increased APP cleavage, we turned our attention to GSK3. We incubated APP-GAL4 expressing cells with the GSK3 inhibitor SB415286 either overnight, i.e. for the whole time of starvation, or for only 1 hour prior to Tyrphostin treatment. We observed, with both incubation times, a small decrease in Luciferase activity under control conditions and a complete block of the increase in Luciferase activity with Tyrphostin treatment (Fig. 6A and B). Our results therefore indicate that, first, GSK3 activity is regulating to some extent the basal turnover of APP and, second, GSK3 activation is a necessary requirement for the Tyrphostin induced increase in APP cleavage. To further examine how starvation and Tyrphostin is impacting the regulation of GSK3, we analyzed by Western blot (Fig. 6C) the expression of the two GSK3 isoforms, GSK3 α and GSK3 β , as well as their activation through dephosphorylation at serine 21 (GSK3 α) and serine 9 (GSK3 β). While GSK3 α did not show an increase in expression due to starving or Tyrphostin treatment, we observed a significant increase in the expression of GSK3 β after starvation (Fig. 6D). However, this elevated expression of GSK3 β was not further increased with Tyrphostin treatment, suggesting that the effect of Tyrphostin treatment after starvation is not solely based on an increase in GSK3 β expression. Next, we analyzed the activation of GSK3 by

dephosphorylation using phospho-specific antibodies for pS21 in GSK3 α and pS9 in GSK3 β (Fig 6E). Starvation induced a small reduction to the phosphorylation of GSK3 α and GSK3 β . More importantly, the phosphorylation of both GSK3 isoforms was strongly reduced by Tyrphostin treatment, indicating that both GSK3 isoforms get activated through interference with the insulin signalling pathway.

Taken together, we showed that APP cleavage is increased after perturbations of IR signalling and that the susceptibility of IR perturbations dependent APP cleavage is greatly enhanced with a period of prior starvation. We identified PI3K activity during the starving period as a necessary step in the sensitization to IR perturbations. Finally, we showed that mTOR does not contribute to increased APP cleavage, but that the activation of GSK3 after IR impairment is responsible for increased APP cleavage.

Discussion

In this study we showed that perturbation of IR signalling pathway reduces the phosphorylation of GSK3 at specific sites and thereby induces GSK3 activity, which leads to an increase in APP processing through β - and γ -secretase activity. Furthermore, we observed that prior starvation increases the susceptibility of the cell to small IR perturbations and enhances the effect on APP processing.

We showed that the IR/IGF-1R inhibitor Tyrphostin at only 2 μ M lead to an increase in APP processing after starvation, while blocking the IGF-1R alone through PPP had no effect (Fig. 3A). Interestingly, we observed that the effect of Tyrphostin was further enhanced by cotreatment with the IGF-1R inhibitor PPP (Fig. 3B). This suggests crosstalk between IR and IGF-1R signalling in the regulation of APP cleavage. Both receptors share some common intracellular signalling molecules like IRS1/2 and Shc¹³. Furthermore, it has been shown that IR and IGF-1R can form hybrid receptors¹⁴, suggesting that a more effective blockade of the signalling of these hybrid receptors is achieved by the combined incubation of Tyrphostin and PPP. Alternatively, our results could also be explained by the finding that IGF-1R activation increases APP processing through the activation of α -secretase¹⁵. In this scenario, the blockade of IGF-1R by PPP would result in reduced APP processing through α -secretase, thereby allowing more APP cleavage through starvation/Tyrphostin mediated β -secretase activity.

Rat models for spontaneous onset of T2D show many characteristics of AD, like increases in A β load and increases in tau protein phosphorylation ¹⁶. Like in T2D, it appears that the brains of AD patients suffer from a reduced glucose utilization and IR signalling impairment ¹⁷. Interestingly, we find that starving HEK293 cells increases APP cleavage as a result of IR perturbations (Fig. 3C and D). Furthermore, we showed that this increase in APP cleavage is dependent on β -secretase activity. In a study, utilizing HEK293 cells that constitutively overexpress β -secretase transcript, it has been shown that β -secretase protein expression is increased after starvation and that this increase was mediated by a posttranscriptional mechanism involving the phosphorylation of eIF2 α ¹⁸. One can therefore speculate that the starvation period in our experiments could increase the expression of β -secretase, therefore making the cleavage of APP through β -secretase more likely. However, we did not observe an increase in luciferase activity with starvation alone, indicating that while the β -secretase dependent cleavage could be increased by starvation, it appears that starvation does not increase γ -secretase dependent cleavage and releases of the APP intracellular domain.

We showed that IR impairment leads to an increase in GSK3 activity after starvation (Fig. 6). Our results indicating that starvation slightly increases the expression of GSK3 β in addition to a small decrease in phosphorylation of GSK3 is in accordance with an earlier study by Jin et al. ¹⁹. Upon Tyrphostin treatment, we observed a strong dephosphorylation of GSK3, which is indicative of GSK3 activation. GSK3 has been described to regulate APP cleavage and A β production, most likely through a process whereby GSK3 phosphorylates and regulates γ -secretase activity ²⁰. Taking all of these results into account, it appears that APP undergoes a two-step cleavage process where starvation increases β -secretase dependent cleavage of APP, which is then followed by a Tyrphostin/GSK3 dependent γ -secretase cleavage. While our study suggests that an impairment in IR signalling leads to an increase in A β production, others have shown that the increased activation of IR activity is increasing APP processing through α -secretase activity ²¹. Hence, it appears that IR regulate APP cleavage in a bidirectional manner, IR activation increases α -secretase dependent cleavage of APP, while the reduction of IR activity in the context of starvation increases β -secretase dependent cleavage of APP.

Finally, we observed that Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity is necessary during the starvation period to observe an increase in Tyrphostin dependent APP cleavage (Fig. 5A and B). Earlier reports have shown that IR activation increases APP cleavage by α -secretase activity and that PI3K is a necessary prerequisite to the vesicular trafficking of APP to the membrane ²¹. Hence, blocking PI3K activity during starvation impairs APP trafficking to the membrane and is therefore in our experiments preventing subsequent APP cleavage by β -secretase. However, besides affecting APP trafficking, PI3K is the upstream positive regulator of AKT, which in turn phosphorylates and therefore blocks GSK3 activity. As such, we expected that the inhibition of PI3K for only 3 hours after starvation would mimic our effects of Tyrphostin on APP cleavage. We observed, however, no effect of PI3K inhibition on APP cleavage under these conditions (Fig. 5B). While the PI3K/AKT/GSK3 pathway has been described in the context of GSK3 inactivation, this pathway might be of little importance for the activation of GSK3, which is achieved through dephosphorylation of GSK3 and, as such, emphasizes the action of a phosphatase. The critical sites in GSK3 (pS21 in GSK3 α and pS9 in GSK3 β) are dephosphorylated by PP1 and PP2A ²². PP2A, however, is actively inhibited by IR stimulation ²³, indicating that IR perturbations by Tyrphostin will activate PP2A which is then dephosphorylating and activating GSK3.

Taken together, we showed that perturbation of IR signalling leads to an increase in APP cleavage. This increase in APP cleavage depends on the activation of GSK3 and is executed by β - and γ -secretase activity. Our results in T2D could contribute to the development of AD through increased APP processing via the amyloidogenic pathway.

References

- 1 Samuel, W., Terry, R. D., DeTeresa, R., Butters, N. & Masliah, E. Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia. *Archives of neurology* **51**, 772-778 (1994).
- 2 Selkoe, D. J. & Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 545-584 (2003).
- 3 Jacobsen, K. T. & Iverfeldt, K. Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**, 2299-2318, doi:10.1007/s00018-009-0020-8 (2009).
- 4 Bird, T. D. Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Genet Med* **10**, 231-239, doi:10.1097/GIM.0b013e31816b64dc (2008).
- 5 Corder, E. H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923 (1993).
- 6 Zhao, W. Q. & Townsend, M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 482-496, doi:10.1016/j.bbadis.2008.10.014 (2009).
- 7 Ott, A. *et al.* Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* **53**, 1937-1942 (1999).
- 8 Steen, E. *et al.* Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signalling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **7**, 63-80 (2005).
- 9 de la Monte, S. M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep* **42**, 475-481 (2009).
- 10 Ho, L. *et al.* Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 902-904, doi:10.1096/fj.03-0978fje (2004).
- 11 Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A. & Feldman, E. L. How does diabetes accelerate Alzheimer's disease pathology? *Nat Rev Neurol* **6**, 551-559, doi:10.1038/nrneurol.2010.130 (2010).

- 12 Zhang, C. *et al.* An AICD-based functional screen to identify APP metabolism regulators. *Molecular neurodegeneration* **2**, 15, doi:10.1186/1750-1326-2-15 (2007).
- 13 Siddle, K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol* **47**, R1-10, doi:10.1530/JME-11-0022 (2011).
- 14 Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. & Vigneri, R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* **30**, 586-623, doi:10.1210/er.2008-0047 (2009).
- 15 Jacobsen, K. T., Adlerz, L., Multhaup, G. & Iverfeldt, K. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced processing of amyloid-beta precursor protein (APP) and APP-like protein 2 is mediated by different metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* **285**, 10223-10231, doi:10.1074/jbc.M109.038224 (2010).
- 16 Li, Z. G., Zhang, W. & Sima, A. A. Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes* **56**, 1817-1824, doi:10.2337/db07-0171 (2007).
- 17 de la Monte, S. M. & Wands, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol* **2**, 1101-1113 (2008).
- 18 O'Connor, T. *et al.* Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* **60**, 988-1009, doi:10.1016/j.neuron.2008.10.047 (2008).
- 19 Jin, N., Kovacs, A. D., Sui, Z., Dewhurst, S. & Maggirwar, S. B. Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation-induced glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death. *Neuropharmacology* **48**, 576-583, doi:10.1016/j.neuropharm.2004.11.010 (2005).
- 20 Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M. & Klein, P. S. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* **423**, 435-439, doi:10.1038/nature01640 (2003).
- 21 Solano, D. C. *et al.* Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**, 1015-1022 (2000).

- 22 Hernandez, F., Langa, E., Cuadros, R., Avila, J. & Villanueva, N. Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biochem* **344**, 211-215, doi:10.1007/s11010-010-0544-0 (2010).
- 23 Ugi, S., Imamura, T., Ricketts, W. & Olefsky, J. M. Protein phosphatase 2A forms a molecular complex with Shc and regulates Shc tyrosine phosphorylation and downstream mitogenic signalling. *Molecular and cellular biology* **22**, 2375-2387 (2002).

Figures and legends

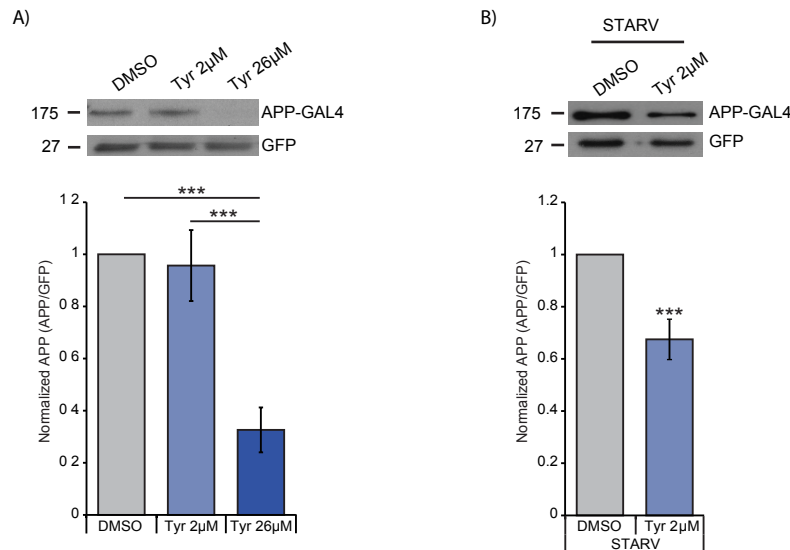


Figure 1. Full-length APP decreases following the IR/IGF-IR blockade with Tyrphostin AG-1024. Starving increases the susceptibility of APP cleavage by Tyrphostin AG-1024.

(A) Western blot and its quantification of APP-GAL4 normalized with GFP in HEK293 co-transfected cells with APP-GAL4 and GFP. Lanes illustrate protein separation with and without Tyrphostin AG-1024 (2μM/26μM) induction; N=6; Significant Kruskal-Wallis One-way ANOVA ($p=0.0029$) with Dunn's Multiple Comparison *post hoc* test **(B)** Western blot and its quantification of APP-GAL4 normalized with GFP in HEK293 co-transfected cells with APP-GAL4 and GFP starved overnight with 0.5%FBS. Lanes illustrate protein separation with and without Tyrphostin AG-1024 (2μM) induction; N=16; Student T-test. (** $p<0.001$; Numbers on the left indicate protein size in kDa; Error bars represent \pm standard error)

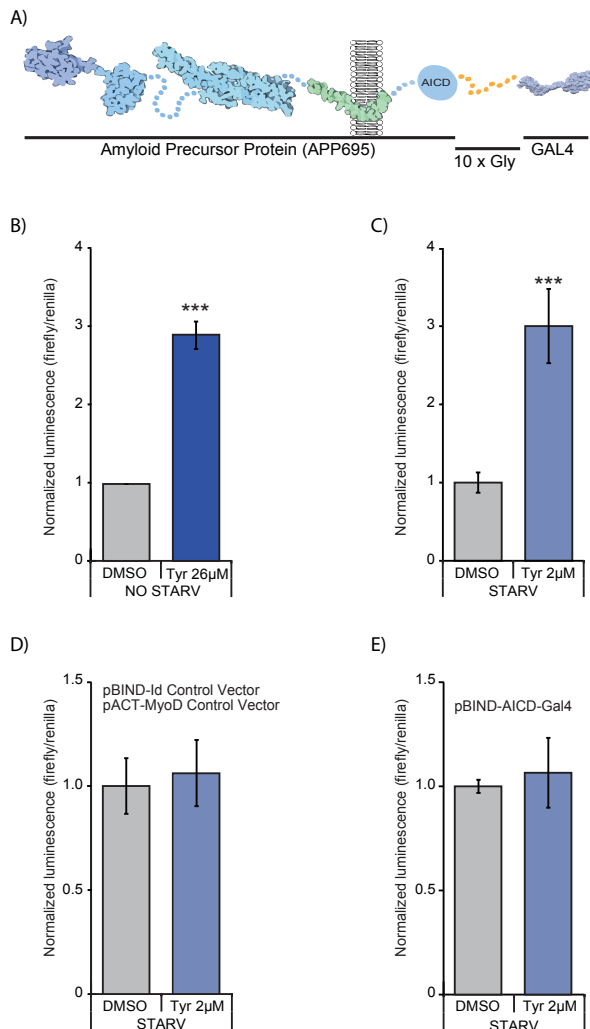


Figure 2. APP cleavage induced following a combination of starving and a low concentration of Tyrphostin AG-1024 can be monitored by luciferase assay.

(A) Fusion protein APP695-GAL4 linked with a flexible chain of 10 glycines. Image modified from doi: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2006_7 and <http://consurf.tau.ac.il/gallery.php> (B) Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells. Columns illustrate treatment with and without Tyrphostin AG-1024 (26μM); N=7; Student T-test (C) Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells starved overnight with 0.5%FBS. Columns illustrate treatment with and without Tyrphostin AG-1024 (2μM); N=10; Student T-test (D) Quantified luciferase assays showing the effects of Tyrphostin AG-1024 on HEK293 transfected cells with two control plasmids from the mammalian two-hybrid system, which

normally serve as positive controls (pBIND-Id and pACT-MyoD, Promega). All cells were starved overnight with 0.5%FBS. Columns illustrate treatment with and without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M); N=9; Student T-test; (E) Quantified luciferase assays showing the effect of Tyrphostin AG-1024 on HEK293 transfected with AICD-GAL4 (APP-GAL4's cleavage product). All cells were starved overnight with 0.5%FBS. Columns illustrate treatment with and without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M); N=9; Student T-test. (***) $p < 0.001$; Error bars represent \pm standard error)

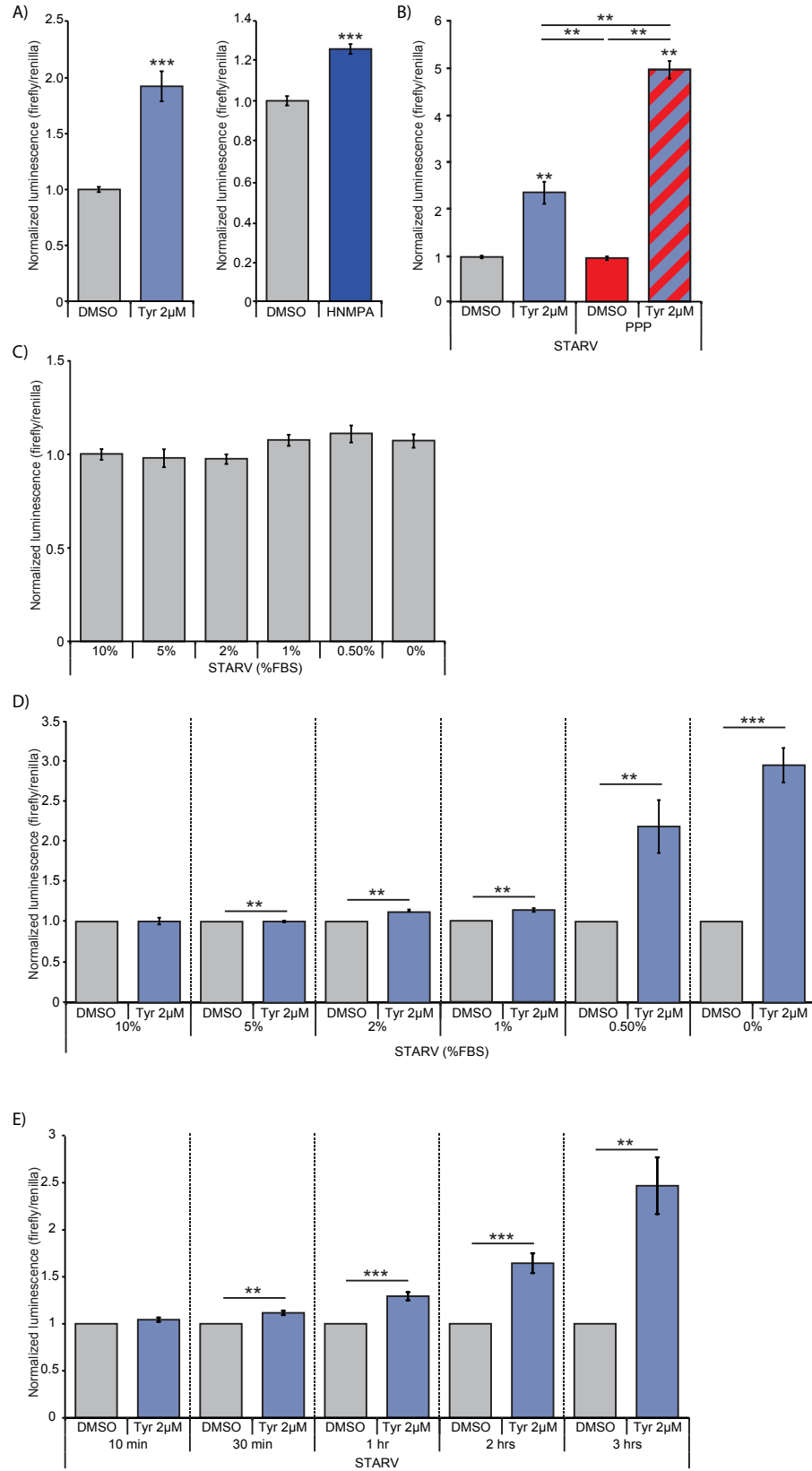


Figure 3. IGF-1R blockade or starvation alone is not sufficient to induce APP cleavage, but starvation increases the susceptibility to a Tyrphostin AG-1024 time dependent increase in APP cleavage.

Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells following various induction protocols. **(A)** All cells were starved overnight with 0.5%FBS. Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) or DMSO and HNMPA(AM)₃ (50 μ M – same time as Tyrphostin) respectively; N=22; Student T-test; **(B)** All cells were starved overnight with 0.5%FBS. Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2 μ M), Picropodophyllin (1 μ M – an hour prior to Tyrphostin) and a combination of Picropodophyllin (1 μ M – an hour prior to Tyrphostin) and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) respectively. Results show that APP cleavage is dependent on IR but not IGF-1R impairment; N=5; Significant Two-way ANOVA for Tyrphostin ($p<0.01$) and PPP ($p<0.01$) with Tukey's HSD (honest significant difference) *post hoc* test **(C)** All cells were starved overnight to a different extent, 10%FBS being no starvation and 0%FBS being complete starvation. Columns illustrate different starvation treatments showing that starvation alone does not induce APP cleavage; 10% FBS N=3, 5%FBS N=3, 2%FBS N=6, 1%FBS N=10, 0.5%FBS N=7, 0%FBS N=10 for different starvation treatments respectively; One-way ANOVA ($p=0.0805$) with Bonferroni's Multiple Comparison *post hoc* test; **(D)** All cells were starved overnight to a different extent, 10%FBS being no starvation and 0%FBS being complete starvation. Columns illustrate treatment with DMSO or with Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) showing that APP cleavage is dependent on starvation when a low concentration of Tyrphostin is used; 10%FBS N=3, 5%FBS N=3, 2%FBS N=6, 1%FBS N=10, 0.5%FBS N=7, 0%FBS N=10 for different starvation treatment respectively; Student T-test to its corresponding control; **(E)** All cells were starved overnight with 0.5%FBS. Columns illustrate treatment with DMSO or with Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) for 10 min, 30 min, 1hr, 2 hrs and 3 hrs respectively; 10 min N=6, 30 min N=6, 1hr N=7, 2hrs N=7, 3hrs N=7 for different time treatment respectively; Student T-test to its corresponding control; (** $p<0.01$, *** $p<0.001$; Error bars represent \pm standard error)

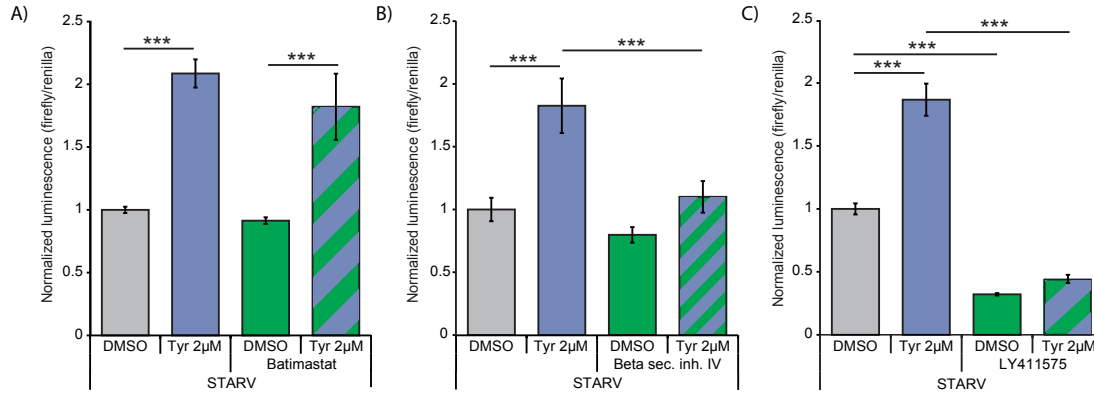


Figure 4. APP cleavage is dependent on beta- and gamma-secretase activity but not on alpha-secretase activity.

Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells following various induction protocols. All cells were starved overnight with 0.5%FBS. (A) Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2µM), Batimastat (10µM – 48 hrs) and a combination of Batimastat (10µM – 48 hrs) and Tyrphostin AG-1024 (2µM); N=9; Two-way ANOVA with an all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) test; (B) Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2µM), Beta-secretase inhibitor IV (10µM – 48 hrs) and a combination of Beta-secretase inhibitor IV (10µM – 48 hrs) and Tyrphostin AG-1024 (2µM); N=7; Two-way ANOVA with an all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; (C) Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2µM), LY411575 (10µM – 48 hrs) and a combination of LY411575 (10µM – 48 hrs) and Tyrphostin AG-1024 (2µM); N=6; Two-way ANOVA with an all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; (***) $p < 0.001$; Error bars represent \pm standard error)

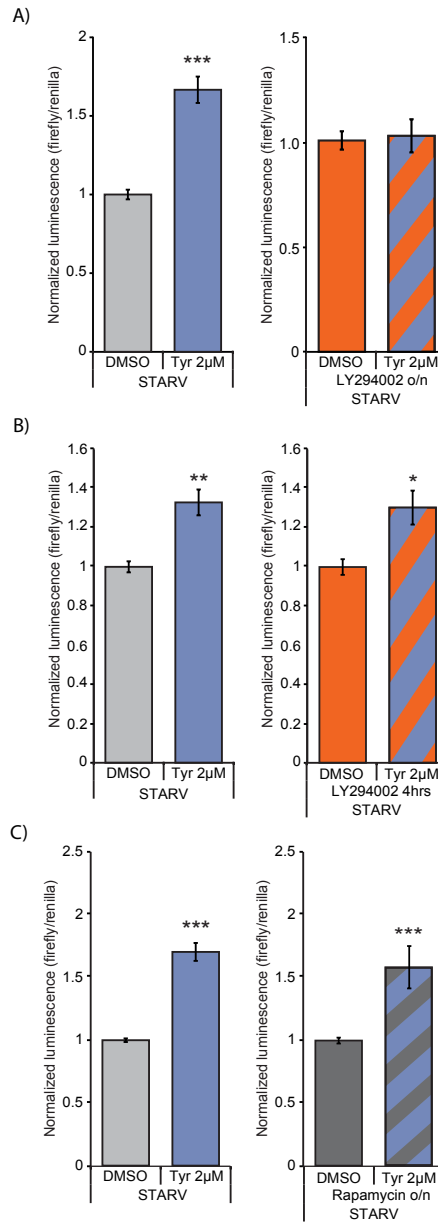


Figure 5. The activation of PI3K during the starvation period increases the susceptibility for a subsequent perturbation in insulin signalling, but has no effect on Tyrphostin mediated increases in APP cleavage. This cleavage is also not dependent upon mTOR signal transduction.

Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells following various induction protocols. All cells were starved overnight with

0.5%FBS. (**A** - **B**) Columns illustrate treatment with DMSO and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) or LY294002 (20 μ M) and a combination of LY294002 (20 μ M) and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) where LY294002 is applied overnight (**A**) or an hour prior to Tyrphostin (**B**); (**A**) N=6; Student T-test (**B**) N=4; Student T-test (**C**) Columns illustrate treatment with DMSO and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) or Rapamycin (1 μ M) and a combination of Rapamycin (1 μ M – overnight) and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) N=6; Student T-test (** p<0.01, *** p<0.001; Error bars represent \pm standard error)

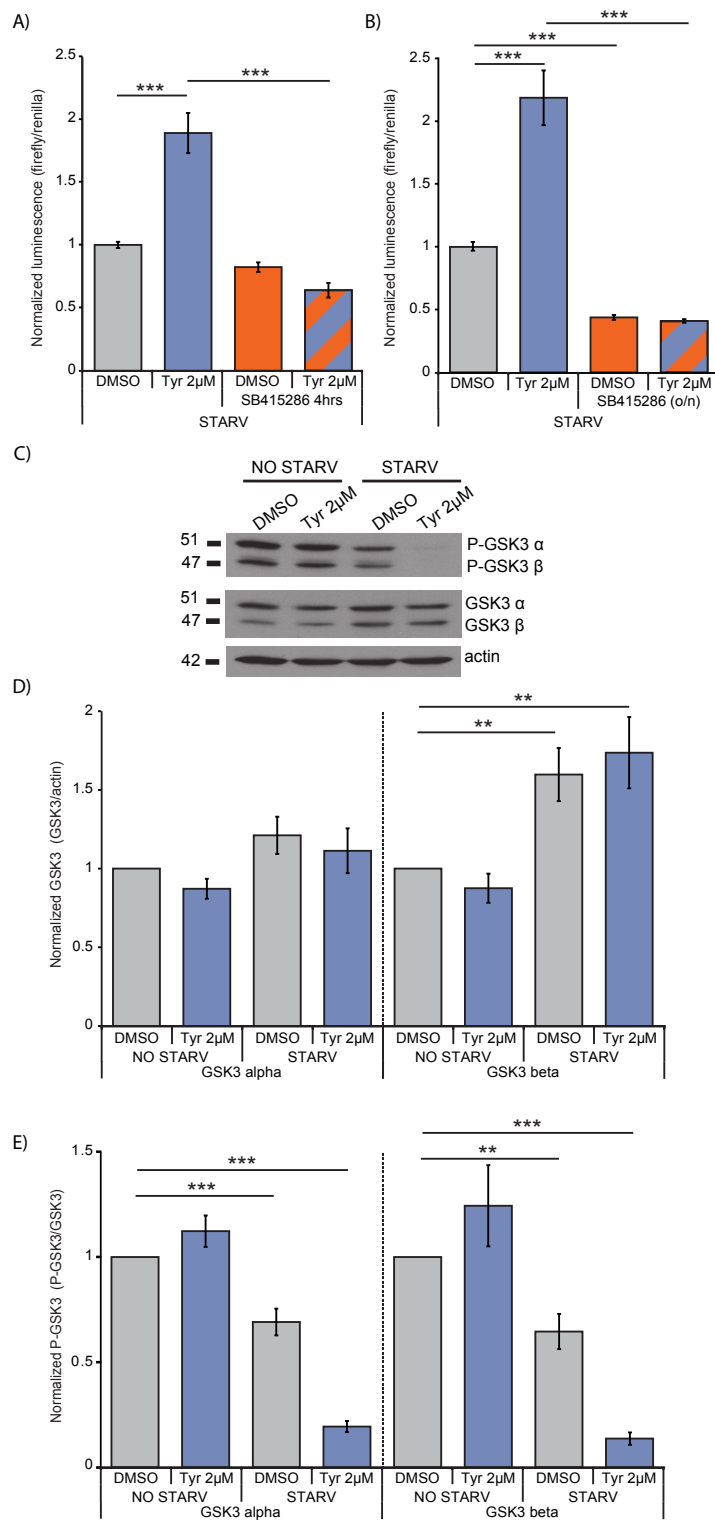


Figure 6. GSK3 activation is a requirement for the Tyrphostin AG-1024 induced increase in APP cleavage.

Quantification of luciferase assays shows APP cleavage in HEK293 transfected cells following various induction protocols. All cells were starved overnight with 0.5%FBS. **(A)** Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2 μ M), SB415286 (20 μ M – an hour prior to Tyrphostin) and a combination of SB415286 (20 μ M – an hour prior to Tyrphostin) and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M); N=5; Two-way ANOVA with an all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; **(B)** Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2 μ M), SB415286 (20 μ M – overnight) and a combination of SB415286 (20 μ M – overnight) and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M); N=6; Two-way ANOVA with an all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; **(C)** Western blot of P-GSK3, total GSK3 and actin in HEK293 co-transfected cells with APP-GAL4 and GFP **(D)** Quantification of GSK3 (GSK3/actin) normalized to control (No Starv - DMSO). Lanes illustrate protein separation with and without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction with or without overnight starvation with 0.5%FBS; N=10; Student T-test compared to its respective control; **(E)** Quantification of P-GSK3 (P-GSK3/GSK3) normalized to control (No Starv - DMSO). Lanes illustrate protein separation with and without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction with or without overnight in starving conditions 0.5%FBS; N=10; Student T-test compared to its respective control; Numbers on the left indicate protein size in kDa; (** p<0.01, *** p<0.001; Error bars represent \pm standard error)

Chapitre 3 : Supplementary Results

APP cleavage is increased after perturbations of insulin receptor signaling and starving greatly enhances this cleavage in cortical neurons.

Materials and methods

Same as described in chapter 2 with the addition of the following.

Mutagenesis

APP-Y653A-GAL4, APP-D664A-GAL4, APP-T668A-GAL4, APP-Y682A-GAL4 and APP-Y687A-GAL4 point mutations were made by site directed mutagenesis using iProof High-Fidelity DNA polymerase (Bio-Rad), directly in the previously described pBIND-APP-GAL4.

Western Blotting

IR (Santa Cruz) was also used.

Drugs

MG-132 (InvivoGen), Chloroquine (Selleckchem), Z-DEVD-FMK (MBL) and insulin were also used.

Primary Neuronal Cultures

Cortices from E18-19 Sprague-Dawley rats were digested in trypsin (0.25%) and mechanically dissociated. Cells were plated onto poly-D-lysine (PDL) coated 6-well (35 mm) dishes at high densities ($8-9 \times 10^5$ cells/ml) for Western blot experiments. Cultures were maintained in Neurobasal medium with 2% B27 supplement, 0.5 mM GlutaMAX supplement (Gibco) and, initially, 5% FBS (HyClone) at 37°C and 5% CO₂. At 1 day *in vitro* (DIV1), half of the media was replaced with a media lacking FBS. At 2 days *in vitro* (DIV2), half of the media was replaced with a media lacking FBS and with cytosine- β -d-arabinofuranoside (Ara-C, 2.5 μ M) to inhibit glial proliferation. Subsequently, a third of the media was replaced

for the media without FBS at DIV5. Neurons were kept until DIV9, starved, when mentioned, by exchanging the conditioned media for Neurobasal (serum and glutamax free) for 3.5 hours and then Tyrphostin was added for another 3 hours. Neurons were then analyzed by Western blot analysis. Cells were washed twice with 1X-PBS, then harvested and homogenized in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, freshly added 1X protease inhibitor (Calbiochem) and 1X phosphatase inhibitor (Thermo Scientific)).

Results

Starvation induced susceptibility to APP processing appears partially located at insulin receptor level.

To assess the levels of P-GSK3 and GSK3 in non-starved conditions, we used Western blots. HEK293 cells were transfected with APP-GAL4 and incubated for 3 hours with 2 μ M or 26 μ M Tyrphostin. Western blot analyses revealed that when cells are not starved but Tyrphostin treatment is increased from 2 μ M to 26 μ M, GSK3 levels are maintained, whereas P-GSK3 levels are significantly decreased with 26 μ M Tyrphostin (Figure 11A-C). Since we only observed APP processing in non-starved cells with 26 μ M Tyrphostin (Figure 1 of the Article), these results indicate that GSK3 is probably also implicated in APP processing in non-starved cells exposed to higher concentrations of Tyrphostin. Therefore, the susceptibility of IR perturbations to APP processing in starved cells seems to be located upstream of GSK3 activation. For this reason, we assessed the level of IR with or without overnight starvation and with overnight starvation with or without 2 μ M Tyrphostin. We observed that IR levels are increased with starvation and then reduced following Tyrphostin induction (Figure 11D-E). This could explain the increased susceptibility to APP processing by IR perturbations following starvation. However, adding insulin to the media prior to Tyrphostin treatment does not prevent APP cleavage, as shown in Figure 11F. Taken together, our results suggest that the induced susceptibility to APP processing by starvation is located upstream of GSK3, probably in part by IR increase following starvation.

GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) affects γ -secretase cleavage.

We previously established that Tyrphostin treatment in combination with starvation with 0.5%FBS increases APP processing via β -secretase, γ -secretase and GSK3 activity. Blocking the activity of these proteins prevented the release of AICD-GAL4 (Figure 4B-C and Figure 6A-B of the Article). To determine whether GSK3 activity acted upon β - or γ -secretase, we observed APP processing via Western blot analysis in the presence of the GSK3 inhibitor SB415286. Because APP processing is known to be sequential, we can assume that GSK3 activity acts mainly on γ -secretase cleavage. Indeed, full-length APP is reduced with Tyrphostin regardless of the presence of GSK3 inhibitors (Figure 12A-B), whereas we

previously established that the release of AICD is blocked by GSK3 inhibition (Figure 6A-B of the Article). Therefore, GSK3 activity affects the amyloidogenic processing pathway's second cleavage : the γ -secretase cleavage.

APP (Amyloid precursor protein) processing induced by the combination of starving and insulin receptor perturbations is independent of proteasome, autophagy or caspase activity.

Using the previously described luciferase based readout system, we analyzed the role of other possible APP processing pathways that could occur with the combination of overnight starvation with 0.5%FBS and 2 μ M Tyrphostin. First, we analyzed the role of proteasomes in APP cleavage by using MG-132, a proteasome inhibitor. We incubated APP-GAL4 expressing cells with MG-132 an hour prior to the 3-hour Tyrphostin treatment. We observed no effect of MG-132 on Tyrphostin dependent increases in luciferase activity indicating that proteasome activity is not responsible for the Tyrphostin mediated increase in APP processing (Figure 13A).

Next, we addressed whether the processing of APP is affected by autophagy. We used Chloroquine, an autophagy inhibitor that acts by increasing the pH of lysosomes (Shintani & Klionsky, 2004). We incubated APP-GAL4 expressing cells with Chloroquine throughout the starvation period and the 3-hour Tyrphostin treatment. Again, we observed no effect on Tyrphostin dependent increase in luciferase activity by Chloroquine indicating that autophagy is not responsible for the Tyrphostin mediated increases in APP processing (Figure 13B). We obtained the same results for Chloroquine applied an hour prior to Tyrphostin (data not shown).

Then, we tested the contribution of caspases by using two different approaches. First, we incubated APP-GAL4 expressing cells with Z-DEVD-FMK, a caspase inhibitor, throughout the starvation period and the 3-hour Tyrphostin treatment. We observed no effect on Tyrphostin dependent increases in luciferase activity by Z-DEVD-FMK indicating that caspase activity is not responsible for the Tyrphostin mediated increase in APP processing (Figure 13C). To further rule out the involvement of caspases, we mutated APP caspase site

D664 through site-directed mutagenesis. We starved APP-D664A-GAL4 expressing cells and then incubated them for a 3 hour Tyrphostin treatment. We observed no effect on Tyrphostin dependent increase in luciferase activity by the caspase site mutation indicating that caspases are not responsible for the Tyrphostin mediated increases in APP processing (Figure 13D). Taken together, our results suggest that there is no contribution of either proteasomes, autophagy or caspases on Tyrphostin dependent luciferase activity indicating that they are not responsible for the Tyrphostin mediated APP processing.

Phospho-null APP (Amyloid Precursor Protein) mutants modulate basal and induced cleavage without preventing it.

To assess the contribution of AICD phosphorylation sites, we performed site-directed mutagenesis to obtain phospho-null mutants. We created three tyrosine phospho-null mutants : APP-Y653A-GAL4, APP-Y682A-GAL4 and APP-Y687A-GAL4. We also created a Thr668 phospho-null mutant, APP-T668A-GAL4. First, we analyzed the role of different phospho-null mutants on basal cleavage by transfecting the different APP phospho-null mutants in HEK293 cells followed by a starvation period. We observed no effect of APP-T668A-GAL4 or APP-Y682A-GAL4 on basal luciferase activity indicating that these mutants do not affect basal APP cleavage compared with APP-WT-GAL4. On the other hand, we observed that APP-Y653A-GAL4 and APP-Y687A-GAL4 have a higher luciferase activity indicating that these mutants undergo higher basal APP cleavage than APP-WT-GAL4 (Figure 14A). We then assessed the contribution of AICD phosphorylation sites on Tyrphostin dependent increases in luciferase activity after starvation. We observed no effect of APP-T668A-GAL4 and APP-Y687A-GAL4 phospho-null mutants indicating that these mutants do not affect induced cleavage by Tyrphostin compared with APP-WT-GAL4. On the other hand, we observed that the APP-Y653A-GAL4 phospho-null mutant has a lower luciferase activity induced by Tyrphostin indicating that this mutant has a lower induced cleavage than APP-WT-GAL4. APP-Y682A-GAL4 phospho-null mutant had a similar trend regarding the induced cleavage by Tyrphostin (Figure 14B). Taken together, our results suggest that even

though none of the mutants prevent APP induced cleavage by Tyrphostin, they can marginally affect basal and induced cleavage in different manners.

APP (Amyloid precursor protein) cleavage is increased after perturbations of insulin receptor signaling and starving greatly enhances this cleavage in cortical neurons.

We wanted to repeat some of our main results in DIV9 cortical neurons to ensure that the effects could be observed with endogenous APP. We used Western blot analysis to assess APP cleavage in neurons. We first analyzed the effect of IR perturbation with 26 μ M Tyrphostin without starvation on full-length APP. Western blot analyses revealed that full-length APP decreases following the 26 μ M Tyrphostin treatment (Figure 15A). We next wanted to test whether we could reproduce the susceptibility to APP processing by IR perturbations through a starvation protocol. To test this we starved cortical neurons with a medium lacking B27 serum for only 3-4 hours before the 2 μ M Tyrphostin treatment. As observed in HEK293 cells, starvation increases the susceptibility to APP processing by IR perturbations with 2 μ M Tyrphostin (Figure 15B). We next assessed the level of IR with starvation and with a combination of starvation and 2 μ M Tyrphostin. Contrary to HEK293 cells, neuronal IR levels are not significantly increased by 3-4 hours of starvation, but they still are reduced with Tyrphostin induction (Figure 15C). The non-significant increase of IR levels observed could be explained by the short starvation period. Nevertheless, P-GSK3 is strongly reduced as observed in HEK293 cells even though total GSK3 is also reduced (Figure 15D-F). In the HEK293 cells, we observed that GSK3 inhibitors prevent the release of AICD-GAL4 (Figure 6A-B of the Article). As in the HEK293 cells, we observed that the reduction in full-length APP in cortical neurons is unaffected by GSK3 inhibitors (Figure 15G-H). Since APP amyloidogenic processing is sequential with β -secretase cleavage followed by γ -secretase cleavage, our results indicate that GSK3 plays a role on γ -secretase rather than β -secretase activity. Taken together, our results suggest that starvation increases susceptibility to small IR perturbations in *neurons* resulting in APP processing.

Figures and legends

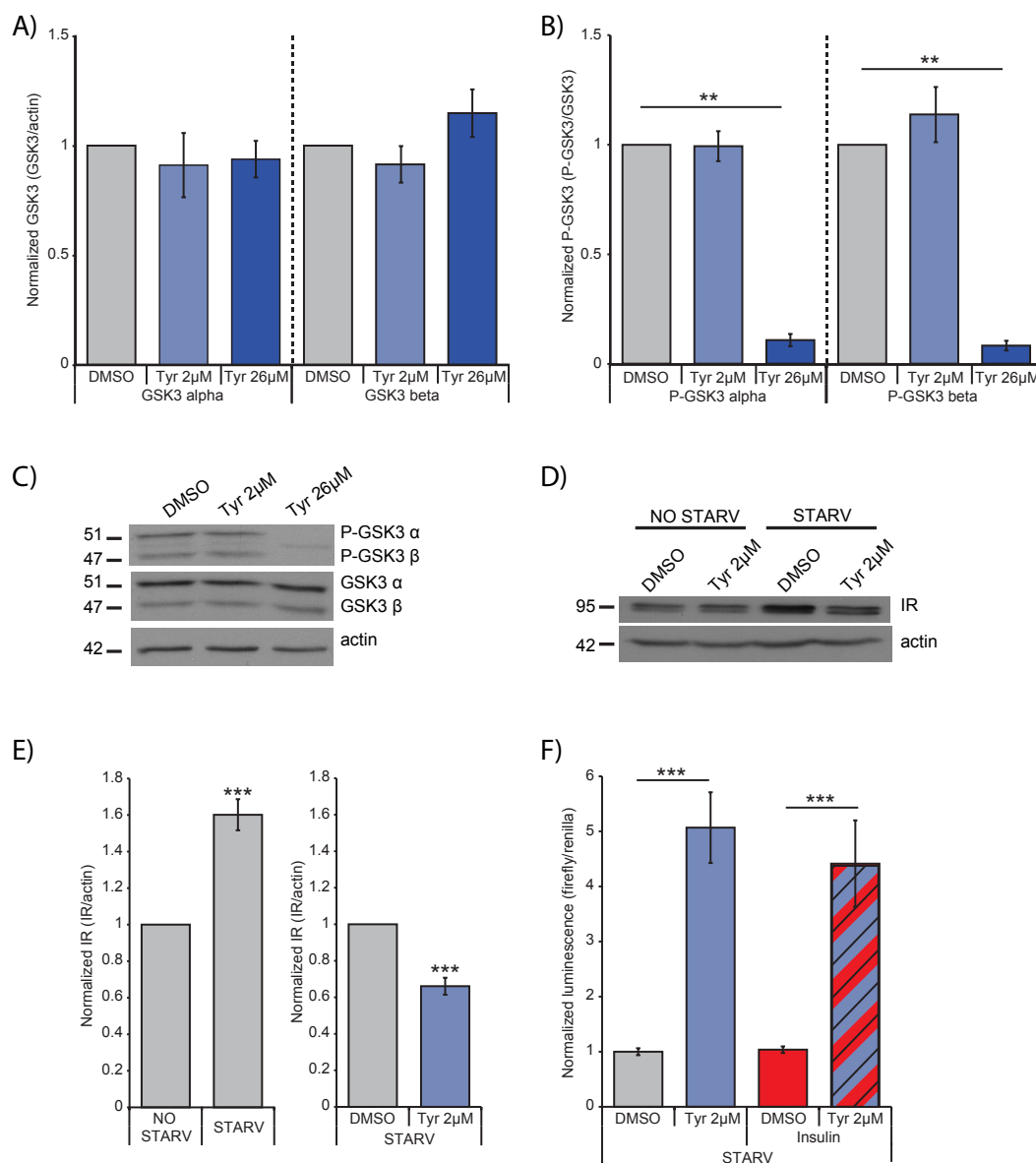


Figure 11. Important decrease in P-GSK3 is also observed in non-starving conditions with higher Tyrphostin concentration, suggesting that starvation induces a susceptibility to APP processing by IR perturbation. Total IR amounts are increased by starving and might be the cause for the increase in starving induced susceptibility to APP processing. However, insulin application cannot prevent APP cleavage.

(A) Quantification of Western blot in (C); Columns illustrate normalized GSK3 with or without Tyrphostin AG-1024 (2μM/26μM) induction; N=5; Non-significant Kruskal-Wallis One-way ANOVA ($p=0.1530$ and $p=0.0970$ for GSK3alpha and

GSK3beta respectively) **(B)** Quantification of Western blots in (C); Columns illustrate normalized P-GSK3 with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M/26 μ M) induction; N=6; Significant Kruskal-Wallis One-way ANOVA ($p=0.0027$ and $p=0.0022$ for P-GSK3alpha et P-GSK3beta respectively) with Dunn's Multiple Comparison *post hoc* test; **(C)** Western blot of P-GSK3, GSK3 and actin in HEK293 co-transfected cells with APP-GAL4 and GFP. Lanes illustrate protein separation with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M/26 μ M) induction; **(D)** Western blot of IR and actin in HEK293 co-transfected cells with APP-GAL4 and GFP. Lanes illustrate protein separation with or without overnight starvation with 0.5%FBS in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction; **(E)** Quantification of Western blot in (D); Columns illustrate normalized IR with or without overnight starvation with 0.5%FBS in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M); N=16; Student T-test to corresponding control; **(F)** Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells. All cells were starved overnight with 0.5%FBS. Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2 μ M), insulin (5mg/ml – an hour prior to Tyrphostin) and a combination of insulin (5mg/ml – an hour prior to Tyrphostin) and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M); N=6; Significant Two-way ANOVA for Tyrphostin ($p<0.001$), but non-significant for insulin ($p=0.514$) with all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; (** $p<0.01$, *** $p<0.001$; Error bars represent \pm standard error)

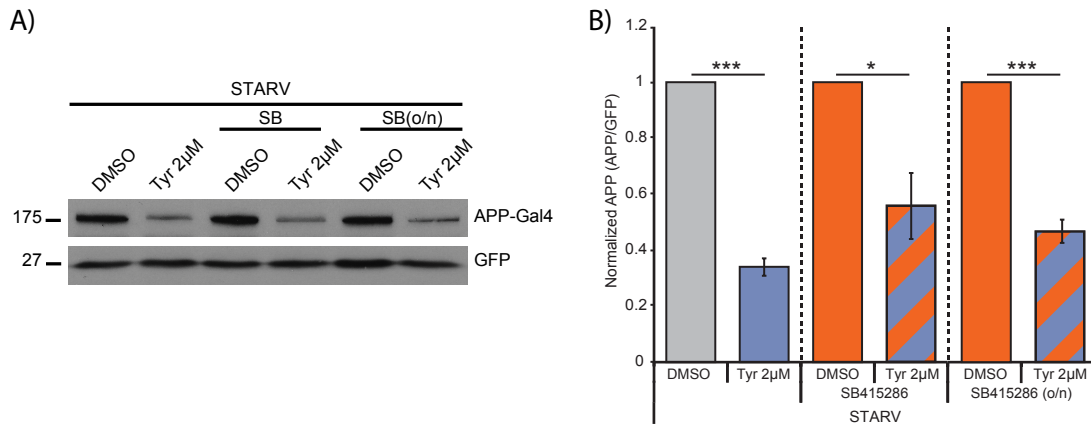


Figure 12. GSK3 inhibition does not prevent the reduction of full-length APP.

(A) Western blot of APP-GAL4 and GFP in HEK293 co-transfected cells with APP-GAL4 and GFP. Lanes illustrate protein separation with overnight starvation with 0.5%FBS in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2μM) induction and with or without SB415286 (20μM) overnight or an hour prior to Tyrphostin induction. (B) Quantification of Western blot in (A); Columns illustrate normalized full-length APP-GAL4 with overnight starvation with 0.5%FBS in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2μM) induction and with or without SB415286 (20μM) overnight or an hour prior to Tyrphostin induction; N=4; Student T-test to corresponding control (DMSO); (*p<0.05, ***p<0.001; Error bars represent ± standard error)

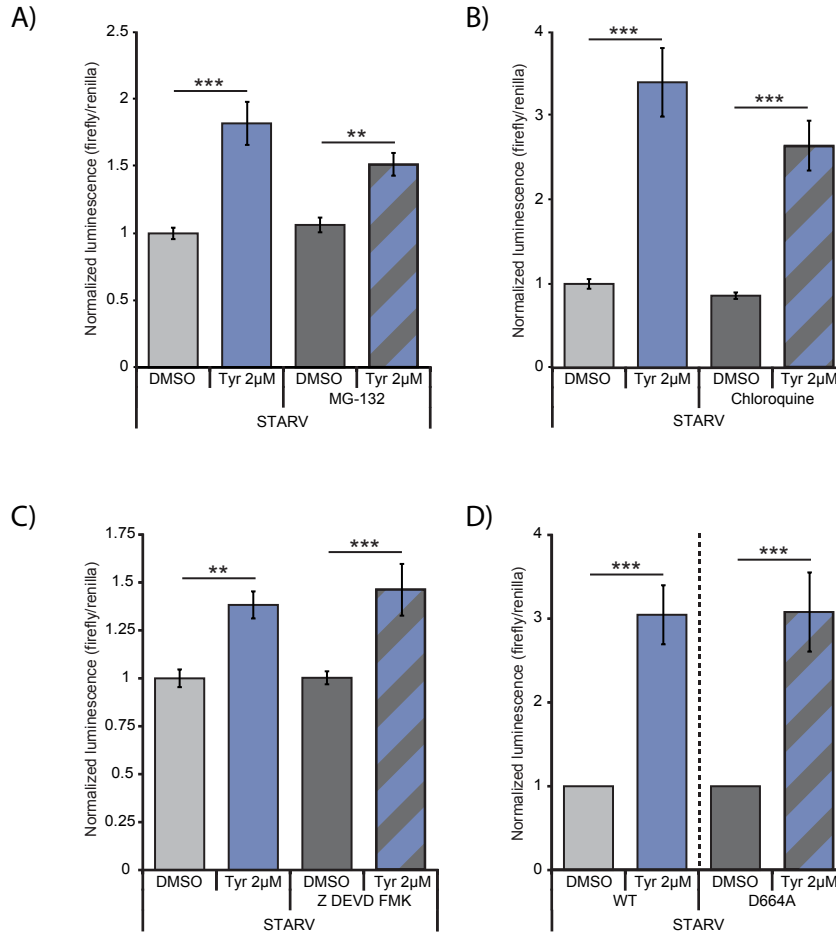


Figure 13. APP processing is independent of proteasome, autophagy or caspase activity.

Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells following various induction protocols. All cells were starved overnight with 0.5%FBS. HEK293 transfected (A-C) with APP-WT-GAL4 or (D) with APP-WT-GAL4 and APP-D664A-GAL4 (A) Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2μM), MG-132 (10μM – an hour prior to Tyrphostin) and a combination of MG-132 (10μM – an hour prior to Tyrphostin) and Tyrphostin AG-1024 (2μM); N=8; Significant Two-way ANOVA for Tyrphostin ($p<0.001$), but non-significant for MG-132 ($p=0.184$) with all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; (B) Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2μM), Chloroquine (100μM – overnight) and a combination of Chloroquine (100μM – overnight) and Tyrphostin AG-1024 (2μM); N=4; Significant Two-way ANOVA for Tyrphostin ($p<0.001$), but non-significant for Chloroquine ($p=0.063$) with all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; (C) Columns illustrate treatment with DMSO, Tyrphostin AG-1024 (2μM), Z-DEVD-FMK (10μM – overnight) and a combination of Z-DEVD-FMK (10μM – overnight) and Tyrphostin AG-1024

(2 μ M); N=4; Significant Two-way ANOVA for Tyrphostin ($p<0.001$) but nonsignificant for Z-DEVD-FMK ($p=0.57$) with all Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) *post hoc* test; (**D**) Columns illustrate treatment with DMSO and Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) on APP-WT-GAL4 or APP-D664A-GAL4 respectively; N=14; Student T-test; (** $p<0.01$, *** $p<0.001$; Error bars represent \pm standard error)

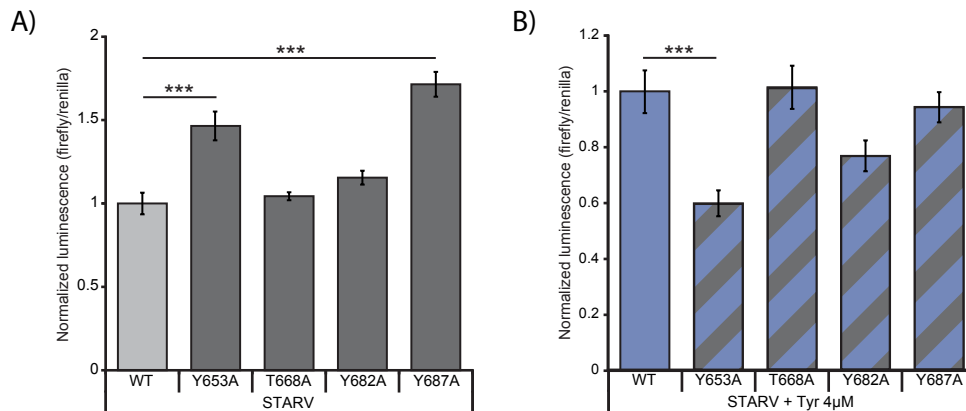


Figure 14. Phospho-null APP mutants modulate basal and induced cleavage without blocking it.

Quantification of luciferase assays showing APP cleavage in HEK293 transfected cells with APP-WT-GAL4, APP-Y653A-GAL4, APP-T668A-GAL4, APP-Y682A-GAL4 or APP-Y687A-GAL4 following various induction protocols. All cells were starved overnight with 0.5%FBS (**A**) Basal cleavage of APP mutants normalized to APP-WT-GAL4 basal cleavage; N=6; Significant One-way ANOVA ($p<0.001$) with Bonferroni's Multiple Comparison post hoc test; Only significant comparisons to APP-WT-GAL4 are shown (**B**) Induced cleavage of APP mutants with Tyrphostin AG-1024 (4μM) normalized to APP-WT-GAL4 induced cleavage; N=6; Significant One-way ANOVA ($p<0.0001$) with Bonferroni's Multiple Comparison post hoc test; Only significant comparison to APP-GAL4-WT is shown; (***) $p<0.001$; Error bars represent \pm standard error)

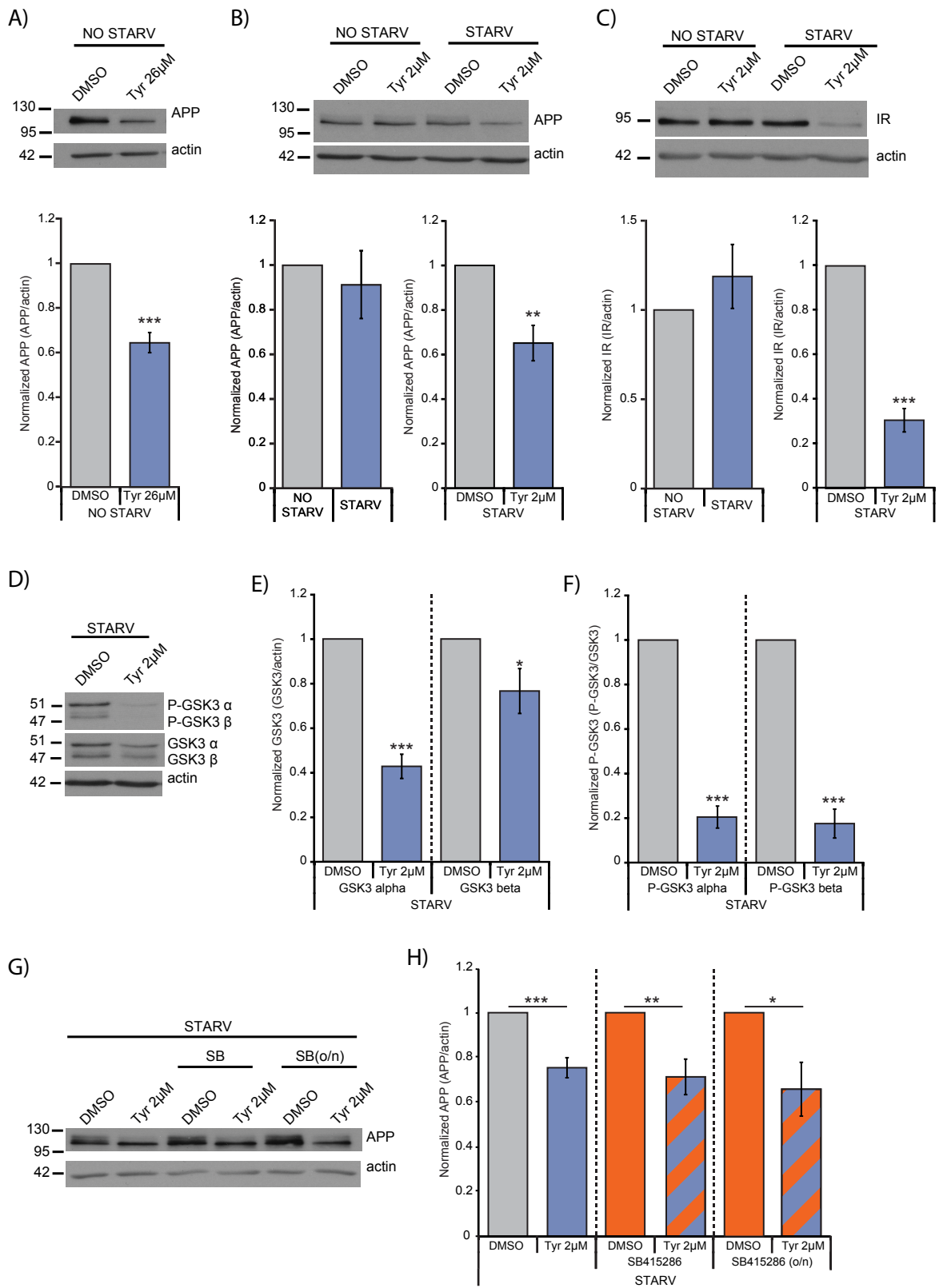


Figure 15. APP processing is increased after perturbations of IR signalling and susceptibility to APP processing by IR perturbation is greatly enhanced by a starving period in cortical neurons. P-GSK3 is also affected by the combination of starvation and IR perturbation. GSK3 activity seems to affect APP processing the same way as observed in HEK293, i.e. via γ -secretase activity.

(A) Western blot and its quantification of full-length APP in DIV9 cortical neurons. Lanes illustrate protein separation with Tyrphostin AG-1024 (26 μ M) induction; N=9; (B) Western blot and its quantification of APP in DIV9 cortical neurons; Lanes illustrate protein separation with or without starvation in B27 free medium (3-4 hours) in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction; N=7; (C) Western blot and its quantification of IR in DIV9 cortical neurons; Lanes illustrate protein separation with or without starvation in B27 free medium (3-4 hours) in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction; N=7; (D) Western blot of P-GSK3, GSK3 and actin in DIV9 cortical neurons; Lanes illustrate protein separation with or without starvation in B27 free medium (3-4 hours) in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction; (E) Quantification of Western blot in (D); Columns illustrate normalized GSK3 with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction; N=7; (F) Quantification of Western blot in (D); Columns illustrate normalized P-GSK3 with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction; N=7; (G) Western blot of APP and actin in DIV9 cortical neurons; Lanes illustrate protein separation with starvation in B27 free medium (3-4 hours) in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction and with or without SB415286 (20 μ M) overnight or an hour prior to Tyrphostin induction. (H) Columns illustrate normalized APP following starvation in B27 free medium (3-4 hours) in combination with or without Tyrphostin AG-1024 (2 μ M) induction and with or without SB415286 (20 μ M) overnight or an hour prior to Tyrphostin induction; N=10 for SB415286 an hour prior to Tyrphostin and N=4 for SB415286 overnight; Student T-test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; Error bars represent \pm standard error.

Chapitre 4 : Discussion

La littérature contient plusieurs exemples montrant les caractéristiques communes de la maladie d'Alzheimer et le T2D. En effet, les phénotypes typiquement Alzheimer comme les dépôts d'A β et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau se retrouvent dans des modèles rongeurs du diabète (Grünblatt *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2015), alors que la résistance à l'insuline, la principale caractéristique du T2D, se trouve également chez les patients Alzheimer (Hoyer, 2002). De plus, les études immunohistologiques sur des cerveaux humains suggèrent l'existence d'une synergie entre ces deux maladies puisque les niveaux d'A β sont plus élevés chez des patients diagnostiqués avec le diabète et la maladie d'Alzheimer que chez les patients diagnostiqués qu'avec l'une ou l'autre des maladies (Valente *et al.*, 2010). En effet, le diabète peut exacerber la pathologie Alzheimer (Ho *et al.*, 2004; McClean *et al.*, 2011; Devi *et al.*, 2012; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2016) et le renversement d'une diète riche en gras (*High fat diet* – « HFD ») diminue l'accumulation d'A β et le déclin cognitif dans une souris modèle Alzheimer (Walker *et al.*, 2017).

Cependant, il est difficile d'identifier le lien précis entre la maladie d'Alzheimer et le T2D. En effet, ces maladies sont identifiées comme des désordres métaboliques multifactoriels complexes (Craft, 2009; Zhao & Townsend, 2009) qui déséquilibrent plusieurs cascades de signalisations. La plupart de ces signalisations sont couplées à des rétroactions positives et négatives. Ceci rend difficile l'identification du potentiel élément critique du T2D pouvant favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer. Bien qu'il existe de nombreuses études *in vivo* sur des rongeurs diabétiques développant des phénotypes Alzheimer suite à plusieurs semaines voire plusieurs mois de diabète (Grünblatt *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Planel *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2015; Morales-Corraliza *et al.*, 2016), l'élément reliant le diabète et la maladie d'Alzheimer demeure flou. De plus, plusieurs études induisent un diabète sur des modèles Alzheimer (Levin-Allerhand *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2004; Julien *et al.*, 2010; McClean *et al.*, 2011; Devi *et al.*, 2012; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2016). Ces résultats indiquent que le diabète peut exacerber le phénotype Alzheimer, mais pas nécessairement qu'il peut le déclencher. C'est pourquoi nous avons étudié la réponse aiguë de l'inhibition de la signalisation de l'insuline sur la protéolyse de l'APP non mutant. Nous pensons que la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline peut, à elle seule, causer le clivage de l'APP et que ce clivage peut être sensibilisé par le jeûne.

Après avoir observé que l'APP est en effet clivé par la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline, nous avons établi la voie de clivage dans les cellules HEK293, puis nous avons confirmé les résultats dans des cultures neuronales de cortex de rats. Les réponses de ces cellules sont plus près des situations biologiques pertinentes à l'étude de la maladie d'Alzheimer sporadique. De plus, l'utilisation de neurones a permis de confirmer que ces effets sont observables à des niveaux normaux d'expression plutôt qu'en surexprimant l'APP. Aussi, nos expériences ont été faites sans aucune mutation Alzheimer.

La perturbation de la signalisation de l'insuline mène au clivage de l'APP (précurseur de la protéine amyloïde).

Nous avons vérifié si les perturbations aiguës de la signalisation des IR mènent à une diminution de l'APP taille pleine par WB (Figure 1A de l'Article). Nous avons partiellement bloqué l'activation en utilisant une concentration bien en deçà de celle nécessaire pour bloquer totalement la signalisation des IR de façon à mieux reproduire la perturbation observée au début de la résistance à l'insuline chez les patients atteints de T2D ou prédiabète (EC₅₀ de l'inhibition de l'autophosphorylation des IR par la Tyrphostin AG-1024 est de 57±5 µM (Parrizas *et al.*, 1997). Pour confirmer que nous assistions bel et bien à une augmentation du clivage de l'APP, nous avons reproduit ces résultats avec notre essai luciférase. Non seulement nous observons que l'APP est clivé suite à la perturbation des IR par la Tyrphostin (Figure 2A de l'Article), mais ce clivage est également dose dépendant de leur inhibition (données non présentées).

La vulnérabilité au clivage de l'APP est induite par le jeûne

Nous avons vérifié ce qu'il advenait de l'APP lorsque les cellules subissaient un paradigme de jeûne puisqu'un rôle de défaillance métabolique est de plus en plus attribué à la maladie d'Alzheimer (Craft, 2009; Zhao & Townsend, 2009; Chen *et al.*, 2014). Pour ce faire, nous avons réduit la quantité de sérum de 10% à 0% pour une durée d'approximativement 18

heures. Ce traitement est beaucoup moins fort que ceux utilisés par O'Connor et collègues (O'Connor *et al.*, 2008) et Velliquette et collègues (Velliquette *et al.*, 2005) qui utilisaient soit un jeûne par privation totale de sérum de 48 heures soit un puissant inhibiteur mitochondrial, l'acide 3-nitropropionique (3-NP).

Suite à notre protocole, le jeûne n'augmente pas significativement le clivage de l'APP (Figure 3C de l'Article). O'Connor et collègues (O'Connor *et al.*, 2008) montrèrent que la privation d'énergie chronique causerait une augmentation de l'expression de la BACE1 et des dépôts d'A β . Cependant, leur modèle chronique *in vivo* subissait un traitement plus agressif avec du 3-NP pour une durée de trois mois alors que notre modèle n'implique qu'un jeûne léger pour une courte période. Par contre, nous avons constaté que notre paradigme de jeûne cause une vulnérabilité au clivage de l'APP suite à la perturbation de la signalisation de l'insuline. En effet, alors que sans jeûne la faible concentration de Tyrphostin 2 μ M n'élicitait pas de clivage (Figure 1A de l'Article), avec jeûne nous observons un grand clivage de l'APP mesurable par la diminution de l'APP taille pleine (Figure 1B de l'Article) et l'augmentation du signal de luciférase (Figure 2C de l'Article). De plus, l'effet semble dépendant de la force du jeûne. En effet, en augmentant la force du jeûne, c'est-à-dire en réduisant la quantité de sérum, nous observons une augmentation de la vulnérabilité au clivage de l'APP à faible concentration de Tyrphostin (Figure 3D de l'Article).

Le jeûne et la signalisation de l'insuline

Une des grandes difficultés dans l'étude des réponses à l'insuline est la similarité des IR avec les récepteurs d'IGF-1 (IGF-1R). En effet, les deux sont ancestralement issus du même gène DAF-2 (de l'anglais *Dauer formation 2*) toujours exprimé chez les invertébrés (Belfiore *et al.*, 2009). La disponibilité des nutriments active DAF-2 pour induire l'activation du métabolisme, de la croissance et de la reproduction. Chez les vertébrés, la présence de deux récepteurs dans ce système a mené à la spécialisation des fonctions, c'est-à-dire que les IR-A régulent le métabolisme du glucose alors que les IGF-1R régulent la croissance et la survie (Hernández-Sánchez *et al.*, 2008; Belfiore *et al.*, 2009). Un troisième récepteur se trouve également chez les mammifères : IR-B (Hernández-Sánchez *et al.*, 2008; Belfiore *et al.*,

2009). De plus, ces récepteurs nécessitent une dimérisation pour être fonctionnels et ils peuvent faire 5 différentes formes hybrides: (a) IGF-1R, (b) HR-A (hybride IGF-1R et IR-A), (c) IR-A, (d) HIR-AB (hybride IR-A et IR-B) et (e) IR-B (Belfiore *et al.*, 2009). L'homologie entre ces récepteurs est très élevée spécialement dans le domaine de tyrosine kinase et de recrutement des substrats (Ullrich *et al.*, 1986; Belfiore *et al.*, 2009). Cette grande homologie explique la difficulté à différencier les effets de la signalisation des IR et ceux des IGF-1R. La Tyrphostin AG-1024 lie le centre actif des deux récepteurs bloquant leur autophosphorylation et créant une distorsion qui empêche la liaison des substrats et de l'ATP aux récepteurs (Posner *et al.*, 1994; Parrizas *et al.*, 1997). Cependant, la Picropodophyllotoxin (PPP) est un inhibiteur sélectif de l'activité des IGF-1R et n'affecte pas l'activité des IR (Girnita *et al.*, 2004).

Tel que mentionné plus tôt, plusieurs études corrélient la résistance à l'insuline des IR au T2D (Belfiore *et al.*, 2009; Himsworth, 2013). L'IR-A serait au centre de la dérégulation causant le diabète (Mosthaf *et al.*, 1991). L'IR-A est également l'isoforme majoritaire dans le cerveau (Mosthaf *et al.*, 1990; Belfiore *et al.*, 2009).

Pour vérifier si les récepteurs IGF-1R sont impliqués dans le clivage de l'APP que nous observons en combinant le jeûne et l'application de Tyrphostin, nous avons reproduit l'expérience en présence de PPP. Nous n'avons pas réussi à reproduire le clivage de l'APP même en combinant le jeûne à une forte concentration de PPP (Figure 3B de l'Article) indiquant que l'APP est clivé suite au blocage de la signalisation des IR et non pas des IGF-1R. De façon intéressante, nous avons noté que la combinaison des deux inhibiteurs potentialise le clivage par la Tyrphostin (Figure 3B de l'Article). Ceci pourrait être expliqué par la présence (plus que majoritaire) des hybrides d'IGF-1R et d'IR présents dans les cellules (Belfiore *et al.*, 2009). Les dimères les plus fréquents dans le cerveau entier sont les hybrides IGF-1R/IR puis les dimères IR et enfin les dimères IGF-1R (Baillyes *et al.*, 1997; Belfiore *et al.*, 2009). Le rôle de l'IGF-1R est moins bien établi malgré qu'il soit tout de même suggéré que sa signalisation soit également perturbée dans le T2D (Vaessen *et al.*, 2001; Gatenby & Kearney, 2010; Imrie *et al.*, 2012). En effet, les IGF-1R et les IR peuvent se dimériser pour former des récepteurs hybrides insulino-résistants (Federici *et al.*, 1998; Gatenby & Kearney, 2010; Imrie *et al.*, 2012). Ainsi, la combinaison de la Tyrphostin avec la PPP pourrait inhiber

plus de HR-A que la faible dose de Tyrphostin le faisait de la même façon que nous avons observé que le clivage est dose dépendant par l'inhibiteur Tyrphostin AG-1024 (données non présentées).

Nous avons ensuite mesuré les niveaux d'IR suite à nos divers traitements. Nous avons observé que le jeûne augmente les niveaux d'IR (Figure 11D-E). Des études de jeûne chez des patients obèses avaient également noté ce phénomène (Bar *et al.*, 1976). En effet, la concentration d'IR totale est inversement corrélée au niveau d'insuline circulatoire, c'est-à-dire qu'une augmentation d'insuline cause une diminution d'IR alors que la diminution d'insuline cause une augmentation d'IR (Bar *et al.*, 1976). Rappelons que le T2D s'établit avec une défaillance de la signalisation de l'insuline menant à une compensation avant d'être totalement résistant à l'insuline (Cholerton *et al.*, 2011; Moreira, 2012; Aulston *et al.*, 2013; Chami *et al.*, 2016) (Figure 10). De la même façon, il a été trouvé que les quantités d'IR sont plus élevées initialement dans les cerveaux Alzheimer malgré la résistance à l'insuline. Ce phénomène est probablement le reflet d'une tentative de compensation pour maintenir l'homéostasie du glucose cérébral (Frölich *et al.*, 1998). De plus, au fur et à mesure de la progression de la maladie, une corrélation inverse entre l'abondance des IR et l'échelle de Braak est observée (Ahmad, 2013; Mantioli & Nitrini, 2015). Nous avons ensuite observé que, suite à l'ajout de la Tyrphostin, les niveaux d'IR redescendent (Figure 11D-E). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les IR liés à la Tyrphostin sont internalisés et coincés avec la Tyrphostin empêchant ainsi leur recyclage (Kahn & Suzuki, 2010). Un phénomène semblable est observé avec l'insuline. En effet, le complexe insuline-IR est normalement recyclé ou dégradé après son internalisation. En dose saturante d'insuline, la dégradation des IR est favorisée (Doherty *et al.*, 1990; Sathianathan *et al.*, 2003). Il est fort probable que ce soit le même phénomène avec la Tyrphostin puisque l'inhibition par les Tyrphostins est transitoire avec une récupération totale des niveaux d'activation après 12 heures (Parrizas *et al.*, 1997). Cette perte serait imputable au métabolisme de la Tyrphostin lié au récepteur, métabolisme qui peut aisément être suivi par la perte de la couleur orangée dans le média. Ainsi, la liaison de la Tyrphostin aux IR pourrait mener à leur dégradation.

Nous avons ensuite testé si la vulnérabilité induite par le jeûne au clivage de l'APP peut être prévenue par l'ajout d'insuline. Nous avons observé que l'ajout aigu d'insuline (1

heure avant la Tyrphostin) ne prévient pas le clivage de l'APP induit par la Tyrphostin en condition de jeûne (Figure 11F). Dans le même ordre d'idée, nous avons observé qu'un blocage de la PI3K, l'effecteur principal de la signalisation de l'insuline, pendant la période de jeûne, empêche le clivage induit par la Tyrphostin sans changer le clivage basal (Figure 5A de l'Article) alors que l'inhibition aiguë de la PI3K après le jeûne ne reproduit pas le clivage de l'APP comme celui observé par l'application de la Tyrphostin (Figure 5B de l'Article). Une explication possible des résultats obtenus en bloquant la PI3K pendant la période de jeûne est que cela empêche l'acheminement de l'APP à la membrane prévenant ainsi le clivage subséquent de l'APP par l'application de la Tyrphostin par la β -secrétase. En effet, il semblerait que la PI3K soit nécessaire à cet acheminement à la membrane (Solano *et al.*, 2000). Une autre possibilité est que nous assistions à une défaillance de la cascade de l'insuline impliquant initialement un effet compensatoire de l'activité des IR anormale pour ensuite induire une forme de résistance à l'insuline. Pirkmajer et Chibalin (Pirkmajer & Chibalin, 2011) montrèrent qu'un jeûne aigu de quelques heures, par opposition à un jeûne chronique, par diminution de FBS dans le média des cultures de cellules HEK293 n'implique pas une simple diminution graduelle de l'activité de la signalisation des IR. En effet, ils observèrent entre autres que l'AMPK et l'Akt, des kinases activées par l'IR, étaient anormalement activées. Ces kinases avaient une activation transitoire avec l'activation relative maximale après quelques heures (6 heures de jeûne pour AMPK; 3 heures pour Akt – 0% FBS) avant de redescendre graduellement vers le niveau basal en poursuivant le jeûne (Pirkmajer & Chibalin, 2011). Cette activation transitoire des IR pourrait s'expliquer par des petites élévations (qualifiées de *mild burts*) de ROS intracellulaires pouvant activer les IR indépendamment de l'insuline (Papaconstantinou, 2009). Cependant, l'exposition prolongée aux ROS inhibe les IR et cause même la résistance à l'insuline (Houstis *et al.*, 2006). Il y a ici un parallèle à faire avec l'établissement de la résistance à l'insuline dans le T2D qui s'établit entre autres via l'augmentation prolongée des ROS (Rains & Jain, 2011; Le Lay *et al.*, 2014; Akintola & van Heemst, 2015).

Talbot et collègues (Talbot *et al.*, 2012; Talbot, 2014) étudièrent la résistance à l'insuline dans des cerveaux de patients Alzheimer. Ils observèrent, entre autres, une diminution de l'activation d'IR (pY) et des diminutions massives de l'activation de l'IRS-1

(pY), de la liaison de l'IRS-1 et de la PI3K et de l'activation d'Akt (pS) dans l'hippocampe (Talbot *et al.*, 2012; Talbot, 2014). Tout comme nous, ils notèrent que l'application d'une dose supplémentaire d'insuline ne rétablissait pas la réponse (Figure 11F) (Talbot, 2014). Puisque la première protéine dans la signalisation de l'insuline montrant une dysfonction majeure est l'IRS-1, il semble que cette molécule soit le facteur central de la résistance à l'insuline dans le cerveau Alzheimer (Moloney *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2012; Talbot, 2014). En effet, non seulement les niveaux protéiques d'IRS-1 et les niveaux d'activation d'IRS-1 (pY) sont diminués dans les neurones Alzheimer, mais ces diminutions sont également associées à une augmentation des niveaux d'IRS-1 inactivés (IRS-1 pS616 et IRS-1 pS636/639) (Moloney *et al.*, 2010). Ces sites de phosphorylation ont récemment été associés à la résistance à l'insuline dans les cerveaux Alzheimer (Arnold *et al.*, 2014; Talbot, 2014). Sachant que la GSK3 joue un rôle dans la résistance à l'insuline périphérique incluant la phosphorylation d'IRS-1 à plusieurs sites (Eldar-Finkelman & Krebs, 1997; Henriksen *et al.*, 2003), il est possible que la GSK3 participe à la phosphorylation des Ser616 et Ser636/639 également (Yarchoan *et al.*, 2014). Du moins, à notre connaissance, cette possibilité n'a pas encore été exclue et reste à explorer.

Tenant compte de nos résultats ainsi que de la littérature, il serait intéressant de vérifier l'état des IR et des IRS-1 dans notre paradigme de jeûne à travers le temps pour savoir si nous assistons à l'établissement d'une forme de résistance à l'insuline. Il serait donc possible que le blocage de la PI3K pendant la période de jeûne empêche cette forme de résistance.

L'effet du jeûne sur les caspases, l'autophagie et le protéasome

L'activité des caspases, de l'autophagie ainsi que des protéasomes est augmentée par le jeûne et pourrait donc participer à la vulnérabilité induite par le jeûne au clivage de l'APP (Mortimore & Schworer, 1977; LeBlanc *et al.*, 1999; Fuertes *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004).

Il existe trois sites de reconnaissance par les caspases dans la séquence de l'APP. Deux se trouvent dans la portion N-terminale de l'APP et une dans la région C-terminale (D664) (Tesco *et al.*, 2003). Le clivage au site D664 cause la libération du fragment C31 (Figure 1) et pourrait favoriser une augmentation de la production d'A β (Gervais *et al.*, 1999; LeBlanc *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000; Galvan *et al.*, 2002; Tesco *et al.*, 2003). Significativement plus

d'APP clivés au site D664 sont trouvés dans les cerveaux Alzheimer que dans les cerveaux contrôles du même âge, plus particulièrement dans l'hippocampe et le cortex (Zhao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2015b). Des études dans des cultures de cellules de neuroblastomes démontrent que le peptide C31 serait un puissant inducteur d'apoptose (Lu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2015b). Quant au jeûne, LeBlanc et collègues (LeBlanc *et al.*, 1999) montrèrent que la caspase-6 est activée et responsable de l'apoptose neuronale suite à la privation de sérum. De plus, ils observèrent que la caspase-6 cause une augmentation en production d'A β dans des cultures neuronales subissant une privation de sérum (LeBlanc *et al.*, 1999).

Pour ces raisons, nous avons étudié le rôle des caspases dans notre clivage. Nous avons observé que le blocage du clivage par les caspases avec un traitement pharmacologique (Figure 13C) ou par mutation du site (Figure 13D) ne prévient pas le clivage induit par la Tyrphostin. Il est important de noter que nos résultats ne sont pas nécessairement contraires à ceux de LeBlanc et collègues (LeBlanc *et al.*, 1999). En effet, nos paradigmes de jeûne pour les HEK293 étaient de 18 heures à 0.5% FBS et pour les neurones de 7 heures sans B27 alors que LeBlanc et collègues (LeBlanc *et al.*, 1999) privaient les neurones de sérum pour une période variant de 12-96 heures. Notre paradigme de jeûne se veut un jeûne beaucoup plus faible pour les cellules, néanmoins manifestement suffisant pour induire une vulnérabilité de la signalisation des IR au clivage de l'APP par la Tyrphostin.

L'autophagie est activée par la privation de nutriments, la privation de facteurs trophiques, la déficience en insuline et d'autres formes de stress cellulaire (Mortimore & Schworer, 1977; Yu *et al.*, 2004). Nous avons observé que l'activation (Rapamycin) ou l'inhibition (chloroquine) de l'autophagie n'ont pas d'effet sur le clivage induit par la combinaison du jeûne et de la Tyrphostin (Figure 13B et Figure 5C de l'Article). Cependant, nous observons une légère diminution du clivage basal en bloquant l'acidification des lysosomes par la Chloroquine (tendance) et une légère augmentation basale en inhibant la mTOR avec la Rapamycin (données non présentées).

Finalement, l'activité du protéasome est augmentée par le jeûne (Fuertes *et al.*, 2003) et pourrait donc participer à la vulnérabilité induite par ce jeûne au clivage de l'APP. Cependant, l'inhibition du protéasome par le MG-132 n'a pas empêché le clivage obtenu par

la Tyrphostin (Figure 13A) indiquant que le protéasome ne joue pas un rôle dans le clivage observé par la combinaison du jeûne et de la perturbation des IR par la Tyrphostin.

Malgré que les concentrations des inhibiteurs étaient optimales, il serait important de faire des contrôles positifs pour éliminer complètement la possibilité que l'autophagie et le protéasome jouent un rôle dans le clivage de l'APP sous ces conditions. Ainsi, par l'augmentation de LC3-II en présence de chloroquine nous aurions pu nous assurer de l'action de la chloroquine et par l'accumulation de protéines ubiquitinées pour confirmer l'action du MG-132.

Le jeûne et la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline causent un clivage par la voie classique amyloïdogénique.

Afin d'établir la voie de clivage impliquée par la combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë des IR par la Tyrphostin, nous avons inhibé les secrétases. Sans surprise, l'inhibition de la γ -secrétase empêche la libération de l'AICD-GAL4 (Figure 4C de l'Article). Cependant, seule l'inhibition de la β -secrétase et non l'inhibition de l' α -secrétase prévient la libération de l'AICD-GAL4 induite par la Tyrphostin (Figure 4A et B de l'Article). De plus, il faut rappeler que notre essai luciférase mesure la libération de l'AICD-GAL4 et non pas directement le clivage par la β -secrétase. C'est pourquoi il serait intéressant de vérifier la quantité d'APP taille pleine sous ces mêmes conditions. De plus, il a préalablement été montré que le jeûne dans des cellules exprimant APP, ADAM10 et BACE1 favorise le clivage amyloïdogénique en diminuant l'expression d'ADAM10 (Lee *et al.*, 2014) et en augmentant l'expression de l'APP et de la BACE1 (Faghihi *et al.*, 2008; O'Connor *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012a; Lee *et al.*, 2014). La diminution d'ADAM10 serait causée par la diminution de la Sirtuin1 (Lee *et al.*, 2014) et l'augmentation de la BACE1 par l'augmentation de NF- κ B (Chen *et al.*, 2012a) ainsi que l'augmentation de l'expression de BACE1-AS (Faghihi *et al.*, 2008), l'ARN antisens non codant de BACE1. Pour ces raisons, il serait intéressant d'observer les niveaux protéiques d'ADAM10, de BACE1, de Sirtuin1 ainsi que de NF- κ B sous nos

conditions de jeûne. La mesure des ARNm ainsi que de BACE1-AS serait également pertinente.

L'état de phosphorylation de l'AICD (*APP intracellular domain* – « AICD ») joue un rôle mineur dans le clivage de l'APP (précurseur de la protéine amyloïde) induit par le jeûne et la perturbation des récepteurs de l'insuline.

Des études MALDI-TOF-MS (de l'anglais *Matrix-assisted laser desorption/ionization* –MALDI – *Time of flight* – TOF – *mass spectrometry* – MS) ont montré que les acides aminés Tyr653, Ser655, Thr668, Ser675, Tyr682 et Tyr687 de la région C-terminale de l'APP peuvent être phosphorylés (Lee *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2008). Cependant, l'état de phosphorylation de ces sites dans les cerveaux Alzheimer demeure à confirmer puisque plusieurs des résultats se contredisent en raison de la difficulté à détecter les phosphorylations de l'APP dans des cerveaux humains *post mortem* (Jacobsen & Iverfeldt, 2009; Schettini *et al.*, 2010). Pour vérifier la contribution des phosphorylations dans notre paradigme de jeûne et de perturbation aiguë des IR par la Tyrphostin, nous avons fait des mutations ponctuelles phospho-nulles dans la séquence de notre protéine APP-GAL4 en transformant certains acides aminés en Ala afin de bloquer la possibilité de phosphorylation à ce site. Ainsi, nos mutations représentent l'état non phosphorylé du site ciblé. Nous avons choisi 4 sites : Tyr653, Thr668, Tyr682 et Tyr687. Nous avons ciblé ces tyrosines puisqu'elles font partie soit d'un motif de reconnaissance d'internalisation soit d'un motif de triage de l'APP (Perez *et al.*, 1999). Nous avons également ciblé la Thr668 puisque plusieurs études lui confèrent une importance particulière dans la maladie d'Alzheimer (Pastorino *et al.*, 2006; Suzuki & Nakaya, 2008; Ma *et al.*, 2012a).

L'abolition d'aucun de ces sites de phosphorylation ne prévient totalement le clivage induit par la Tyrphostin (Figure 14B). Cependant, nous avons observé que le clivage basal est augmenté pour les mutants Y653A et Y687A (Figure 14A). Il semble que ces sites de phosphorylation influencent la localisation cellulaire de l'APP. De façon surprenante, la

Thr668 ne semble pas influencer la libération de l'AICD-GAL4 dans notre système luciférase. En effet l'abolition de ce site n'a ni influencé la libération de l'AICD-GAL4 basale ni celle induite par la Tyrphostin (Figure 14)

La Tyr653 fait partie d'un motif de triage ⁶⁵³YTSI⁶⁵⁶. Cette tyrosine a été identifiée pour le triage efficace de l'APP au compartiment basolatéral dans des cellules polarisées (Haass *et al.*, 1995a; Haass *et al.*, 2012). Suite à l'abolition du site Tyr653 par une mutation phopho-nulle Y653A, l'holoprotéine APP liée à la membrane est transportée de façon aléatoire aux deux surfaces plutôt que préférentiellement à la surface basolatérale (De Strooper *et al.*, 1995; Haass *et al.*, 1995a). La BACE1, quant à elle, est dirigée vers la surface apicale et basolatérale (Capell *et al.*, 2002; Haass *et al.*, 2012) alors que l' α -secrétase n'est dirigée que vers la surface basolatérale (Wild-Bode *et al.*, 2006; Haass *et al.*, 2012). Ainsi, l' α -secrétase et la β -secrétase compétitionnent pour le clivage de l'APP à la surface basolatérale, mais le clivage amyloïdogénique est favorisé à la surface apicale par la β -secrétase. Le mutant Y653A augmente donc probablement la distribution aléatoire, égale, de l'holoprotéine APP aux deux surfaces (Figure 14A). L'augmentation du clivage basal serait alors expliquée par l'augmentation de la contribution de la β -secrétase. Cependant, le clivage induit par la Tyrphostin normalisé au clivage basal du mutant phopho-nul APP-Y653A est inférieur à celui de la forme sauvage (APP-Y653A+Tyr / APP653A versus APP-WT+Tyr / APP-WT) puisque cette réduction est le reflet de l'augmentation du clivage basal (Figure 14B). C'est donc dire que la quantité totale de clivage induit par la Tyrphostin ne diffère pas pour la forme sauvage ou la forme mutante lorsque comparée au clivage basal de la forme sauvage (APP-Y653A+Tyr / APP-WT versus APP-WT+Tyr / APP-WT) (données non présentées). Ainsi, l'abolition du site de phosphorylation Tyr653 augmente probablement le clivage basal en changeant le triage d'APP, mais cette abolition n'influence pas davantage sa localisation et son clivage suite à l'application de la Tyrphostin puisque le clivage total demeure le même.

Les tyrosines de la région ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ seraient plutôt impliquées dans l'endocytose et le renouvellement protéique de l'APP. Perez et collègues (Perez *et al.*, 1999) montrèrent que l'APP portant une mutation abolissant la phosphorylation du site Tyr687 avait une endocytose normale, mais son renouvellement (*turnover*) protéique était affecté. En effet, la mutation Y687A augmente de 50% la demi-vie de l'APP taille pleine. Il n'est donc pas

surprenant d'observer une augmentation presque doublée du clivage basal par rapport à l'APP de type sauvage (Figure 14A), une augmentation également observée dans le clivage total induit par la Tyrphostin de ce mutant (données non présentées). En effet, la quantité totale du clivage induit par la Tyrphostin est grandement augmentée pour la forme mutante par rapport à la forme sauvage lorsque comparée au clivage basal sauvage (APP-Y687A+Tyr / APP-WT versus APP-WT+Tyr / APP-WT) (données non présentées). Cette augmentation de la demi-vie de l'APP pourrait également expliquer pourquoi l'induction du clivage par la Tyrphostin par rapport au clivage basal ne varie pas entre la forme sauvage APP-WT (APP-WT+Tyr / APP-WT) et la forme mutante APP-Y687A (APP-Y687A+Tyr / APP-Y687A) (Figure 14B). En effet, cette apparente égalité est le reflet de l'augmentation du clivage basal égal à l'augmentation du clivage induit du mutant APP-Y687A (données non présentées).

Finalement, il semblerait que notre dernier mutant, Y682A, soit impliqué dans l'endocytose. En effet, la mutation APP-Y682A diminue l'internalisation et la sécrétion d'A β y serait étroitement corrélée (Perez *et al.*, 1999). Selon les études de Perez et collègues (Perez *et al.*, 1999), le signal d'internalisation dominant pour l'endocytose clathrine dépendante est le motif ⁶⁸²YENP⁶⁸⁵. Étrangement, le clivage basal de la forme mutante APP-Y682A n'est pas changé (Figure 14A) dans notre essai luciférase. Il faut, par contre, tenir compte du fait que l'essai luciférase ne discrimine pas le clivage par l' α -secrétase ou la β -secrétase. Il est possible que suite à la perturbation de l'endocytose par l'abolition du site de phosphorylation Y682A, une forme de compensation du clivage par l' α -secrétase se produise. En effet, il a été montré que le blocage de l'APP dans l'un ou l'autre des compartiments augmente le clivage par la secrétase de ce même compartiment (Grbovic *et al.*, 2003; Carey *et al.*, 2005). Cependant, le clivage induit par le jeûne combiné à la perturbation des IR est légèrement diminué par rapport au clivage de l'APP-WT (tendance – Figure 14B). Ces données suggèrent que le clivage induit pourrait être influencé par l'internalisation puisque lorsqu'une partie de son signal est abolie, l'induction diminue un peu. Cependant, de même que pour le clivage basal, l'essai luciférase ne peut différencier le type de clivage. Il serait donc intéressant de répéter l'expérience en présence d'inhibiteurs de l' α -secrétase. Il est aussi possible que nous n'assistions pas à une plus grande diminution du clivage (basal et induit) puisque le signal d'internalisation inclut la séquence complète ⁶⁸²YENP⁶⁸⁵. En effet, Perez et collègues (Perez *et al.*, 1999) montrèrent

que Asn684 et Pro685 étaient également impliqués dans l'internalisation, c'est-à-dire que l'abolition de n'importe quel de ces sites diminuait l'internalisation. De plus, ils observèrent également que la diminution de l'internalisation suite à l'abolition du site Tyr682 était moins grande que celle de l'abolition du site Asn684 ou Pro685 seule ou encore l'abolition double Tyr682/Asp684.

L'activité de la GSK3 (de l'anglais *Glycogen synthase kinase 3*) est nécessaire au clivage induit par la combinaison du jeûne et de la perturbation de la signalisation de l'insuline par la Tyrphostin.

Tout d'abord, nous avons observé l'effet de l'inhibition de l'activité de la GSK3 par un inhibiteur sélectif: SB415286. Nous observons par essai luciférase que l'inhibition aiguë ainsi que l'inhibition pendant le jeûne de la GSK3 empêchent totalement le clivage de l'APP et la libération de l'AICD-GAL4 qui est normalement observée lors de l'induction par la Tyrphostin (Figure 6 de l'Article). Pour confirmer la spécificité pour la GSK3, nous aurions pu répéter cette expérience avec un autre inhibiteur puissant et sélectif de la GSK3 : CT99021 (Bain *et al.*, 2007). Il est important de rappeler que l'essai luciférase quantifie la libération de la partie C-terminale de l'APP-GAL4. En effet, nous ne pouvons pas affirmer avec ces résultats que la GSK3 agit sur le clivage par la BACE1 ou par la γ -secrétase. Afin de vérifier sur quelle secrétase agit la GSK3, nous avons observé par WB la quantité totale d'APP taille pleine sous ces mêmes conditions (Figure 12A-B). Sachant que le clivage de l'APP est séquentiel et que nous observons une diminution de l'APP taille pleine par WB avec la Tyrphostin en présence de SB415286 alors que nous observons une baisse de la luminescence par essai luciférase, nous pouvons supposer que l'activité de la GSK3 agit sur la γ -secrétase et que l'inhibition de la GSK3 empêche le clivage par la γ -secrétase. Ces résultats ne sont pas nécessairement étonnants puisque la PS1 a été identifiée comme substrat de la GSK3 (Kirschenbaum *et al.*, 2001b). De plus, Phiel et collègues (Phiel *et al.*, 2003) observèrent une accumulation de fragments CTFs avec l'application de lithium, un inhibiteur de la GSK3. Suite à leurs résultats, ils conclurent que l'inhibition de la GSK3 bloquait le clivage de l'APP à l'étape de la γ -secrétase (Phiel *et al.*, 2003).

Nous avons également observé que l'état d'activation de la GSK3 est grandement affecté dans nos conditions de jeûne et de perturbation aiguë des IR. Alors que nous observons une petite diminution de la phosphorylation des Ser21/Ser9 suite au jeûne, nous observons une diminution beaucoup plus importante de ces phosphorylations avec la combinaison du jeûne à la perturbation des IR indiquant une importante diminution de l'inhibition de la GSK3 α et GSK3 β respectivement (Figure 6C-E de l'Article). Il semble que le jeûne sensibilise l'activation de la GSK3 puisque le clivage obtenu par une dose plus élevée de Tyrphostin sans jeûne diminue également fortement la phosphorylation de la GSK3 alors qu'elle demeure semblable avec l'application seule d'une petite dose de Tyrphostin (Figure 11B-C).

Pour confirmer que la GSK3 est très active dans nos conditions de jeûne et de perturbation des IR, nous pourrions observer l'état de phosphorylation de la Tau (Li & Paudel, 2006; Wang *et al.*, 2013) ainsi que la quantité de β -caténine puisque sa phosphorylation par la GSK3 la cible pour sa dégradation (Rubinfeld *et al.*, 1996). Il aurait été également intéressant d'observer la phosphorylation des Tyr279 et Tyr216 pour la GSK3 α et la GSK3 β respectivement. En effet, ces phosphorylations sont nécessaires à l'activité de la GSK3. De plus, il est possible qu'une activation transitoire des IR avec le jeûne cause une activation biphasique de la GSK3. Après l'application d'insuline, il y a une activation rapide et transitoire de la GSK3 via l'augmentation de la phosphorylation de ses tyrosines par Fyn suivie d'une inhibition de la GSK3 par sa phosphorylation au niveau de ses sérines par PI3K/Akt (Lesort *et al.*, 1999). Ainsi, il est possible que notre jeûne augmente la phosphorylation des tyrosines activatrices de GSK3. Ceci pourrait expliquer nos résultats obtenus avec l'application d'inhibiteur de la PI3K pendant la période de jeûne.

Alors, serait-il possible que le jeûne augmente les phosphorylations des tyrosines de la GSK3 et que l'application de Tyrphostin, quant à elle, vienne empêcher les phosphorylations inhibitrices sur les sérines de la GSK3 tout en favorisant leur déphosphorylation? Pourtant, l'inhibition aiguë PI3K n'a pas reproduit le clivage (Figure 5B de l'Article). En effet, les deux phosphatases déphosphorylant la GSK3 en ses Ser21/Ser9 sont la PP1 (protéine phosphatase 1) et la PP2A (protéine phosphatase 2A) (Morfini *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2010). L'une d'elles, la PP2A, est activement inhibée par la stimulation des IR via la protéine Shc (Ugi *et al.*, 2002), une protéine qui se trouve en amont de la PI3K. Puisque la PI3K est l'un des

premiers régulateurs de la cascade de signalisation de l'insuline menant au blocage de la GSK3, nous nous serions attendus à ce que l'inhibition de la PI3K augmente également le clivage. Cependant, bien que l'activation de l'insuline inhibe la GSK3 par la voie PI3K/Akt, ceci pourrait ne pas être pertinent pour l'activation de la GSK3 via la déphosphorylation de ses sérines. Ainsi, la perturbation des IR permettrait à la PP2A de déphosphoryler et d'activer la GSK3, alors que l'inhibition seule de la PI3K ne serait pas suffisante. Alors, pour identifier la cause de l'importante diminution de phosphorylation des sérines de la GSK3 lors de la combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë des IR, il serait intéressant de mesurer l'activité de la PP1 et de la PP2A. Le jeûne pourrait donc favoriser la phosphorylation des tyrosines de la GSK3 alors que la Tyrphostin viendrait diminuer la phosphorylation aux sérines par déphosphorylation active. En d'autres mots, la sensibilisation induite par le jeûne à la Tyrphostin serait donc due à la préactivation de la GSK3 par la phosphorylation de ses tyrosines (Figure 16).

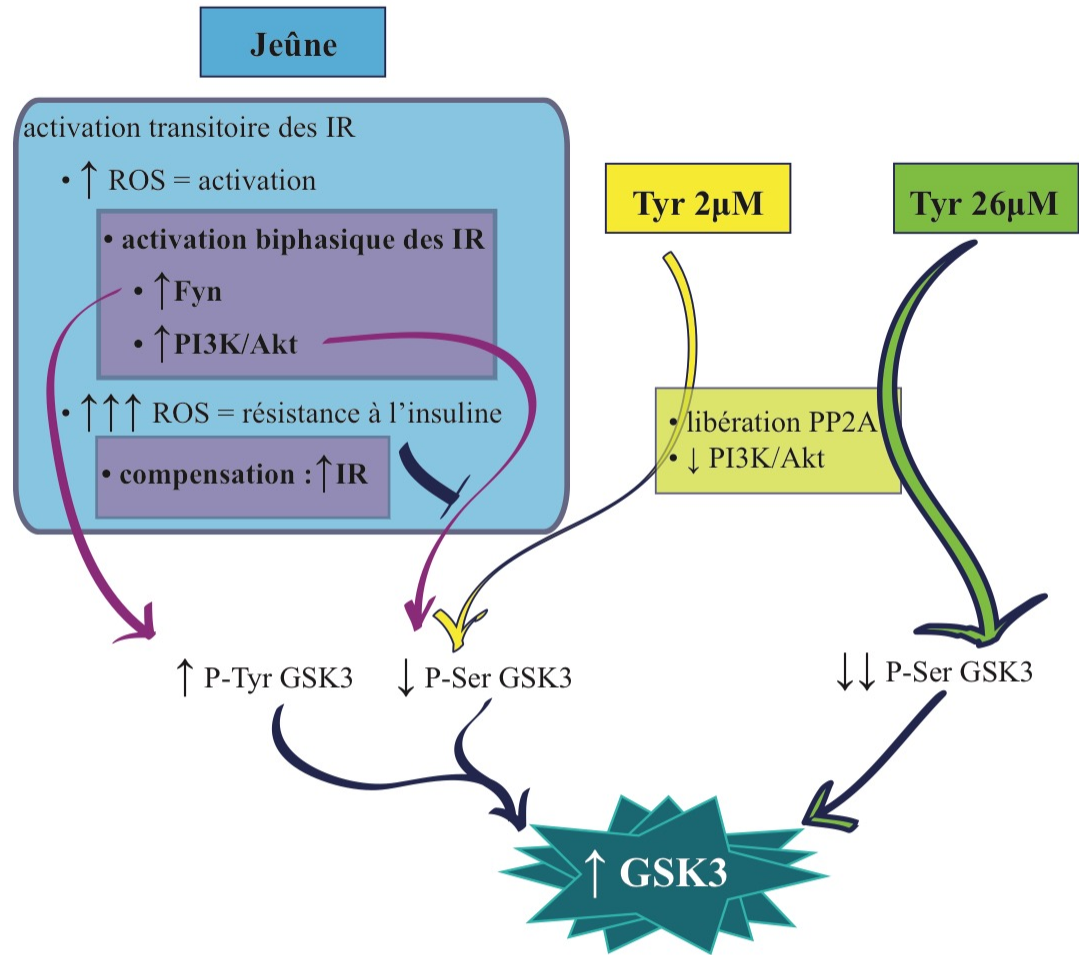


Figure 16. Modèle explicatif de l'activation de la GSK3 par la perturbation aiguë des IR ainsi que la sensibilisation induite par le jeûne à une petite perturbation des IR.

La perturbation des IR avec 26μM empêche la phosphorylation de la GSK3 aux sérines inhibitrices (Ser21/Ser9 pour les GSK3α et GSK3β respectivement) via la diminution de l'activation de la voie PI3K/Akt et la libération de PP2A. PP2A peut activement déphosphoryler les sérines inhibitrices. En situation de jeûne, les IR sont transitoirement activés par l'augmentation des ROS. L'activation des IR étant biphasique, la GSK3 est initialement activée par la phosphorylation de ses tyrosines (Tyr279/Tyr 216 pour les GSK3α et GSK3β respectivement) par Fyn, puis la GSK3 est inhibée par la phosphorylation de ses sérines. L'accumulation des ROS cause éventuellement une résistance à l'insuline qui bloque la phosphorylation des sérines inhibitrices de la GSK3. C'est probablement la combinaison de la phosphorylation des tyrosines activatrices et de la diminution des phosphorylations des sérines inhibitrices qui permet de reproduire l'activation de la GSK3 observée avec la Tyrphostin 26μM suite à la combinaison du jeûne et de la Tyr 2μM. Image produite par Sara Licea.

Confirmation des résultats dans des neurones corticaux

Nous avons choisi d'utiliser les HEK293 puisqu'elles sont faciles à manipuler. De plus, leur origine rénale a été remise en question puisqu'elles expriment plusieurs caractéristiques des neurones immatures (marqueurs, neurofilaments, etc.) (Shaw *et al.*, 2002). En effet, il a été suggéré qu'elles seraient plutôt de descendance neuronale (Shaw *et al.*, 2002). Puisque les HEK293 expriment les protéines pertinentes à notre étude, c'est-à-dire les protéines impliquées dans la cascade de signalisation de l'insuline et les sécrétases clivant l'APP (Kao *et al.*, 2004; Kirkin *et al.*, 2007; Uemura *et al.*, 2007; Pirkmajer & Chibalin, 2011), nous les avons utilisées pour l'établissement des voies impliquées.

Nous avons ensuite confirmé certains de nos résultats dans des cultures neuronales corticales exprimant l'APP endogène non mutant. Nous avons d'abord observé que l'APP taille pleine endogène non mutant est également diminué par la perturbation aiguë des IR (Figure 15A). Par la suite, nous avons vérifié que nous pouvons reproduire cette même forme de vulnérabilité au clivage de l'APP par la faible perturbation de la signalisation de l'insuline lorsque nous appliquons un jeûne aux cultures neuronales. Nous avons constaté qu'un court jeûne de moins de 7 heures (incluant le temps d'induction avec la Tyrphostin) diminuait l'APP taille pleine lorsque la Tyrphostin à faible dose était ajoutée alors que le jeûne seul ne changeait pas la quantité d'APP taille pleine endogène (Figure 15B). Nous avons aussi confirmé que la quantité totale d'IR diminue toujours suite à l'application de Tyrphostin (Figure 15C) fort probablement parce que les IR liés à la Tyrphostin sont internalisés, coincés et, puisqu'ils ne peuvent pas être recyclés, ils sont dégradés (Kahn & Suzuki, 2010).

Nous voyons également dans les neurones que l'état d'activation de la GSK3 est grandement influencé par la combinaison du jeûne et de la perturbation des IR. En effet, ces traitements provoquent une forte diminution de la phosphorylation à la Ser21/Ser9 pour la GSK3 α et GSK3 β respectivement (Figure 15D et F). Alors que le jeûne seul ou la Tyrphostin seule n'affectent pas la phosphorylation de cette façon (Figure 17). Encore une fois, le profil de phosphorylation des Tyr279/Tyr216 serait intéressant à observer.

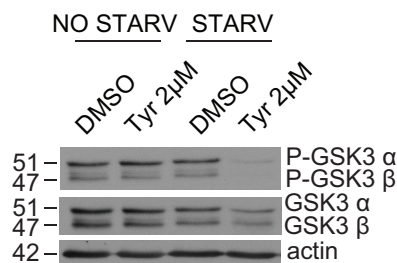


Figure 17. La combinaison du jeûne et de la Tyrphostin diminue fortement la phosphorylation inhibitrice à la Ser21 et à la Ser9 de la GSK3 α et GSK3 β respectivement dans les neurones corticaux.

Figure reprise de la Figure 15D : Western blot complet représentatif des niveaux protéiques des deux isoformes de la GSK3 endogène dans des neurones corticaux DIV9 suite à divers protocoles d'induction : ici en condition ou non de jeûne (STARV) et avec ou sans inhibiteur Tyrphostin AG-1024 (2 μ M). Ligne 1 : Anticorps contre la phosphorylation Ser21/Ser9 de la GSK3 α et GSK3 β respectivement; Ligne 2 : Anticorps contre la GSK3 α et GSK3 β totale; Ligne 3 : Anticorps contre l'actine. Les chiffres représentent la taille en kDa.

Ensuite, nous avons quantifié l'APP taille pleine lorsque l'activité de la GSK3 est bloquée avec SB415286. Nous avons constaté que l'APP taille pleine est diminuée (Figure 15G-H) de façon semblable à la diminution observée dans les HEK293 (Figure 12A-B). Ces résultats supportent l'idée selon laquelle la GSK3 agit fort probablement sur l'activité de la γ -secrétase.

Nous avons aussi obtenu quelques données préliminaires indiquant que le blocage de l' α -secrétase ne semble pas influencer la diminution de l'APP taille pleine dans des neurones corticaux suite à la combinaison du jeûne et de la Tyrphostin. En effet, il semble y avoir une augmentation d'APP taille pleine suite à l'application de Batimastat en raison d'une diminution de clivage basal alors que l'APP taille pleine diminue tout de même suite à l'application de la Tyrphostin (données non présentées). Ces résultats préliminaires semblent indiquer que le clivage observé dans ces conditions dans les neurones n'est également pas médié par l'activité de l' α -secrétase.

Futures pistes de recherche

Préséniline

Pour étudier un peu plus l'hypothèse selon laquelle la GSK3 agit sur la γ -secrétase, il serait intéressant de répéter l'expérience du blocage de l'activité de la GSK3 avec un inhibiteur de la β -secrétase. Le clivage de l'APP est séquentiel commençant par l'activité de la β -secrétase suivi de l'activité de la γ -secrétase (Vassar & Citron, 2000). Nous ne nous attendrions donc pas à observer de diminution d'APP taille pleine par WB en bloquant l'activité de la β -secrétase ainsi que l'activité de la GSK3.

Phiel et collègues (Phiel *et al.*, 2003) montrèrent qu'en bloquant l'activité de la GSK3, il y avait une accumulation de fragments C-terminaux (CTFs) d'APP suggérant un problème au niveau du site de clivage de la γ -secrétase. À l'aide de siRNA, ils démontrèrent que cet effet était médié par la GSK3 α . Hurtado et collègues (Hurtado *et al.*, 2012) trouvèrent également que le *knockdown* spécifique de la GSK3 α diminue la formation de plaques séniles et la formation de NFTs alors que le *knockdown* spécifique de GSK3 β n'affecte que les NFTs. Ceci implique que les deux paralogues influencent la phosphorylation de la protéine Tau, mais que seule la GSK3 α influence l'A β . Il serait intéressant de vérifier si nous observons également une augmentation des fragments CTFs de l'APP en inhibant les GSK3 par WB avec notre paradigme de jeûne et de perturbation des IR. Puis, à l'aide de siRNA contre les PS, nous pourrions vérifier si nous observons une augmentation semblable des CTFs suite à la combinaison du jeûne et de la Tyrphostin à celle obtenue en bloquant les GSK3.

L'interaction de la GSK3 avec la PS1, la protéine catalytique centrale du complexe γ -secrétase, a été démontrée dans des cellules en culture impliquant potentiellement la GSK3 comme composante de la γ -secrétase (Tesco & Tanzi, 2000; Ryder *et al.*, 2003; Takasugi *et al.*, 2003). De plus, la PS1 a été identifiée comme substrat de la GSK3 (Kirschenbaum *et al.*, 2001a). En effet, la possibilité que la GSK3 régule la fonction de la PS1 a été mise de l'avant suite à l'identification de sites de phosphorylation conservés dans la PS1 (Kirschenbaum *et al.*, 2001b; Twomey & McCarthy, 2006). Il semble que deux sites régulent l'interaction de la PS1 avec la β -caténine (Kirschenbaum *et al.*, 2001a; Twomey & McCarthy, 2006; Uemura *et al.*, 2007), alors qu'un autre modifie le renouvellement (*turnover*) du fragment CTF de la PS1

(Kirschenbaum *et al.*, 2001b; Twomey & McCarthy, 2006). Ce serait la phosphorylation de la Ser397 de la PS1 par la GSK3 qui régulerait sa stabilité (Kirschenbaum *et al.*, 2001b; Twomey & McCarthy, 2006) et ce site ne requerrait pas de phosphorylation proximale préalable (*unprimed substrate*) (Twomey & McCarthy, 2006). Pour l'instant, les conséquences pathologiques de ce phénomène ne sont pas encore connues. Cependant, puisque la structure dimérique de la préséniline (NFT + CTF) forme la partie fonctionnelle de la γ -secrétase, il est fort probable que la perturbation de l'une ou l'autre de ces composantes contribue au développement de la maladie d'Alzheimer (Kirschenbaum *et al.*, 2001b; Takasugi *et al.*, 2003).

Ainsi, l'expression d'une PS1 mutante phospho-nulle S397A de pair avec l'abolition de la PS1 sauvage par siRNA pourrait aider à mieux comprendre l'apport de la GSK3 à la PS1 dans notre paradigme de jeûne et de perturbation de la signalisation de l'insuline par la Tyrphostin. Aussi, il serait intéressant de vérifier si nous assistons à une augmentation générale de l'activité de la γ -secrétase ou si cela est plutôt spécifique à l'APP. Pour ce faire, l'état de clivage d'autres substrats connus de la γ -secrétase comme Notch pourrait être suivi suite à nos traitements. Une autre façon de déterminer l'augmentation de l'activité de la γ -secrétase sur l'APP serait de transfecter dans les HEK293 la protéine APP-GFP, où la GFP est liée à la portion C-terminale de l'AICD. De cette façon, nous pourrions visualiser l'activité de la γ -secrétase dans nos traitements puisqu'une activité plus importante de la γ -secrétase implique la libération de l'AICD-GFP dans le cytosol, alors que l'APP-GFP ainsi que le CTF α -GFP et le CTF β -GFP sont localisés aux membranes comme le démontrèrent Florean et collègues (Florean *et al.*, 2008). Il est possible que l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome comme MG-132 ou la lactacystin soit nécessaire pour la visualisation d'AICD-GFP puisque l'AICD-GAL4 est rapidement dégradé (Edbauer *et al.*, 2002).

Peu d'intérêt est généralement donné aux sites de phosphorylation de la PS1 régulant sa liaison avec le complexe β -caténine/N-cadhérine dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Il semble pourtant que cette phosphorylation diminue la PS1 à la surface membranaire tout en diminuant la capacité de clivage de la γ -secrétase pour la N-cadhérine sans affecter sa capacité de clivage des CTFs de l'APP (Uemura *et al.*, 2007). Ainsi, l'expression d'une PS1 mutante phospho-nulle S353A/S357A ou d'une PS1 mutante phospho-

mimétique S353D/S357D de pair avec l'abolition de la PS1 sauvage par siRNA, pourrait faciliter la compréhension de l'apport de la GSK3 sur la localisation de la PS1 dans notre paradigme de jeûne et de perturbation de la signalisation de l'insuline par la Tyrphostin.

Endocytose

Un autre aspect intéressant à étudier serait l'endocytose de l'APP. En effet, nous savons que le site principal de clivage de l'APP par la BACE1 se trouve dans les endosomes puisque le pH y est optimal pour l'activité enzymatique de la BACE1 (Haass *et al.*, 1992; Vassar *et al.*, 1999). Cependant, l'APP et la BACE1 ne prennent généralement pas la même voie pour se rendre aux endosomes (Sannerud *et al.*, 2011). En effet, il semblerait que l'APP et la BACE1 se retrouvent dans les endosomes précoces (*early endosomes*) par différentes voies : une voie Arf-6 (de l'anglais *ADP-ribosylation factor 6*) dépendante pour la BACE1 et une voie clathrine dépendante pour l'APP (Figure 18) (Nordstedt *et al.*, 1993; Sannerud *et al.*, 2011).

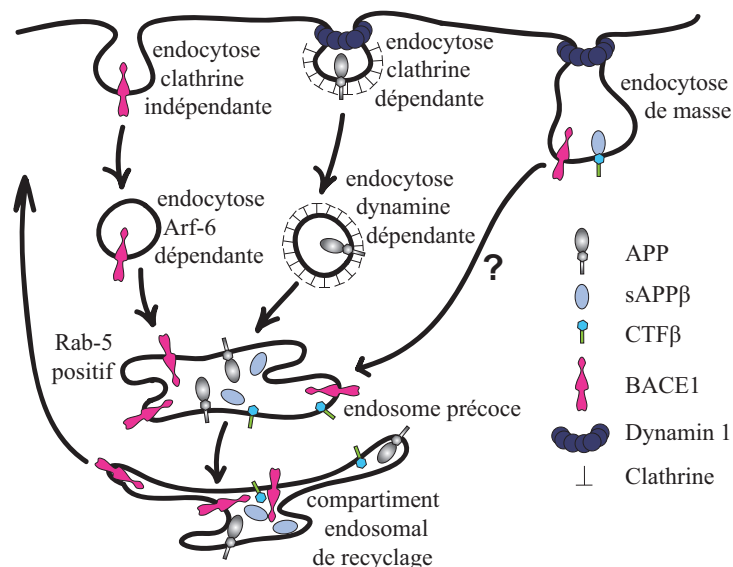


Figure 18. Représentation schématique de l'endocytose de l'APP et de la BACE1.

L'APP est normalement endocyté par une voie clathrine et dynamine dépendante alors que la BACE1 est endocytée par une voie Arf-6 dépendante, une voie indépendante de la clathrine et la dynamine. Les deux se retrouvent dans les endosomes précoces (*early endosomes*) positifs pour Rab-5. Il est également possible que l'APP et la BACE1 subissent une endocytose de masse, une forme d'endocytose observée lorsque la GSK3 n'est pas inhibée (Smillie & Cousin, 2011); Image produite par Sara Licea, inspirée par (Sannerud *et al.*, 2011).

Arf-6 est associée à la sous-catégorie des voies clathrine indépendantes (Donaldson *et al.*, 2009; Grant & Donaldson, 2009). Arf-6 se localise à la membrane plasmique et dans les compartiments endosomaux pour réguler le transport de protéines membranaires qui n'ont pas la séquence typique de reconnaissance par la clathrine (Donaldson *et al.*, 2009; Sannerud *et al.*, 2011). Sannerud et collègues (Sannerud *et al.*, 2011) démontrèrent que la BACE1 nécessite l'activité de Arf-6 pour rejoindre l'APP dans les endosomes précoces. C'est dans les endosomes précoces positifs pour Rab-5 que se ferait la majorité du clivage amyloïde. Il est possible d'augmenter l'endocytose en surexprimant Rab-5, ce qui favorise le clivage amyloïdogénique (Grbovic *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que, dans le cerveau, la GSK3 participe à l'endocytose des récepteurs AMPA de plusieurs façons, entres autres, en phosphorylant un facteur liant et inhibant la Rab-5. Ainsi, l'activité de la GSK3 permet

l'internalisation des récepteurs AMPA par une voie clathrine/Rab-5 dépendante (Wei *et al.*, 2010a). Il est donc possible que la GSK3 affecte l'endocytose d'autres protéines par ce mécanisme.

Il a été montré que bloquer l'internalisation de l'APP en inhibant la dynamine à long terme diminue le clivage amyloïdogénique et augmente le clivage non amyloïdogénique (Carey *et al.*, 2005). Pour ces raisons, il serait intéressant d'observer les changements de la localisation de l'APP ainsi que celle de la BACE1 dans les HEK293 suite au jeûne puis à la perturbation des IR. L'utilisation d'étiquettes fluorescentes sensibles au pH comme SEP (*Superecliptic pHluorin*), pHluorin2 (Mahon, 2011) ou encore pHuji (Shen *et al.*, 2014) ainsi que l'étude de la colocalisation de Arf-6 et Rab-5 avec l'APP et la BACE1 nous donnerait encore plus d'informations sur les mécanismes empruntés. Naturellement, l'usage des mutants décrits plus tôt (APP-Y653A, -Y682A et -Y687A) sous ces conditions pourrait également démystifier le transport de l'APP.

L'endocytose et le recyclage des vésicules synaptiques sont étroitement contrôlés par un cycle de phosphorylation et déphosphorylation de la dynamine 1. Puisqu'un rôle synaptique pour l'APP est suggéré par de nombreuses études et que l'endocytose de l'APP est clathrine et dynamine dépendante (Nordstedt *et al.*, 1993), il est probable que l'APP soit affecté par ces mêmes mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation de la dynamine 1 (Figure 19). Le trafic de l'APP via les vésicules synaptiques a été démontré, mais l'apport de l'internalisation de l'APP via l'endocytose de masse (*bulk endocytosis*), l'invagination d'une large portion de la membrane plasmique pour former un grand endosome, reste encore à établir (Figure 18) (Groemer *et al.*, 2011).

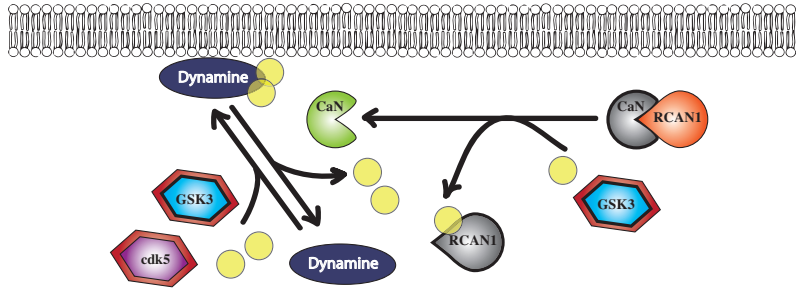


Figure 19. Recyclage vésiculaire contrôlé par l'état de phosphorylation de la dynamine

La dynamine 1 est constitutivement phosphorylée aux terminaisons nerveuses (Tan *et al.*, 2003). La CaN peut déphosphoryler la dynamine 1 et provoquer l'endocytose (Lai *et al.*, 1999) alors que sa rephosphorylation relocalise la dynamine 1 à la membrane et la prépare pour un autre cycle d'endocytose clathrine dépendante (Tan *et al.*, 2003). La dynamine 1 peut également être impliquée dans l'endocytose de masse (Clayton *et al.*, 2010) suite à la phosphorylation successive par la cdk5 (Ser778) et la GSK3 (Ser774) (Clayton *et al.*, 2010). La déphosphorylation subséquente de ses sérines par la CaN provoque l'endocytose de masse (Clayton *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2010). La GSK3 pourrait également favoriser l'activité de la CaN puisque la phosphorylation de RCAN1 par la GSK3 empêche RCAN1 de lier et d'inhiber la CaN; Image produite par Sara Licea;

La dynamine 1 est constitutivement phosphorylée aux terminaisons nerveuses (Tan *et al.*, 2003). Une phosphatase importante pour sa déphosphorylation est la calcineurine (CaN). Cette déphosphorylation provoque l'endocytose (Lai *et al.*, 1999) alors que la rephosphorylation relocalise la dynamine 1 à la membrane et la prépare pour un autre cycle d'endocytose clathrine dépendante (Tan *et al.*, 2003). La rephosphorylation de la dynamine 1 se fait entre autres par la cdk5 (Tan *et al.*, 2003). La dynamine 1 peut également être impliquée dans l'endocytose de masse (Figure 18) (Clayton *et al.*, 2010). Dans cette forme d'endocytose, la dynamine 1 est phosphorylée par la cdk5 (Ser778) et la GSK3 (Ser774) (Clayton *et al.*, 2010). La déphosphorylation subséquente par la CaN provoque cette endocytose de masse (Figure 19) (Clayton *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2010).

En plus de préparer un cycle d'endocytose de masse, la GSK3 pourrait également favoriser l'activité de la CaN. En effet, la CaN est normalement inhibée par RCAN1 (de l'anglais *Regulator of Calcineurin 1*). L'activité et la dégradation de RCAN1 seraient régulées

par des phosphorylations dépendantes de la GSK3 (Hilioti *et al.*, 2004; Smillie & Cousin, 2011), c'est-à-dire que la phosphorylation de RCAN1 par la GSK3 empêche RCAN1 de lier et d'inhiber la CaN. Simplement dit, l'activité de la GSK3 pourrait libérer la CaN qui pourrait provoquer l'endocytose clathrine dépendante ainsi que l'endocytose de masse (Figure 18 et Figure 19). Notre laboratoire a montré pour la première fois dans les neurones que durant la LTD, le RCAN1 et la CaN seraient justement régulés par la GSK3. Une fois libérée, la CaN pourrait alors agir sur ses différentes cibles et participerait, entre autres, à l'endocytose des récepteurs AMPA (Dudilot *et al.*, en écriture).

Sachant que dans notre paradigme de jeûne et de perturbation des IR par la Tyrphostin nous causons une forte diminution de l'inhibition des GSK3, il serait intéressant de vérifier si, sous ces conditions, la GSK3 provoque une augmentation de l'endocytose de l'APP et de la BACE1 expliquant le clivage par la voie amyloïdogénique observée. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons effectué quelques expériences préliminaires suggérant un apport de l'endocytose.

Tout d'abord, nous avons observé l'effet de l'inhibiteur de la dynamine, Dynasore, sur la quantité d'APP taille pleine avec notre paradigme de jeûne et de perturbation des IR dans des neurones corticaux. Sous ces conditions, nous observons que le blocage aigu de la dynamine empêche la diminution d'APP taille pleine suite à l'application de Tyrphostin (données non présentées). Cependant, l'inhibition aiguë de la dynamine diminue l'APP taille pleine par rapport à l'APP sans dynamine (données non présentées). Cette diminution de l'APP taille pleine observée par l'application de Dynasore pourrait être expliquée par deux phénomènes: (a) l' α -secrétase prend la relève du clivage, tel que décrit par Carey et collègues (Carey *et al.*, 2005; Carey *et al.*, 2011) ou (b) le blocage aigu de la dynamine empêche le cycle de recyclage vers la membrane plasmique favorisant le clivage efficace de l'APP déjà localisé dans les endosomes par la BACE1, tel que les études par Sannerud et collègues (Sannerud *et al.*, 2011) suggèrent. Carey et collègues (Carey *et al.*, 2005; Carey *et al.*, 2011) montrèrent que l'inhibition de la dynamine peut favoriser l'augmentation du clivage par l' α -secrétase à long terme puisque l'APP ne peut plus être endocyté. De plus, ces conditions causent également l'augmentation de l'expression de l' α -secrétase (Carey *et al.*, 2005; Carey *et al.*, 2011). Nous ne croyons pas que ce soit le phénomène que nous observions, puisque tout d'abord la durée

d'application de Dynasore semble insuffisante et, de plus, l'application d'inhibiteur de l' α -secrétase ne change pas les résultats observés (données non présentées). Ainsi, nous pensons que le blocage de la dynamine favorise le clivage de l'APP déjà localisé aux endosomes puisque le retour à la membrane est bloqué. Sannerud et collègues (Sannerud *et al.*, 2011) observèrent qu'en utilisant un mutant d'Arf-6 empêchant le recyclage de la BACE1, l'APP présent était efficacement clivé par la BACE1 dans les endosomes et nous pensons que nous assistons à un phénomène semblable, mais via la localisation de l'APP. En effet, l'APP présent aux endosomes y serait coincé en raison de l'inhibition de la dynamine. Cet APP serait efficacement clivé par la BACE1. L'application subséquente de Tyrphostin ne permet pas l'internalisation supplémentaire d'APP puisque l'inhibition de la dynamine bloque l'endocytose : il n'y a donc pas d'augmentation d'APP internalisé pour le clivage par la BACE1 (données non présentées).

Cependant, lorsque nous appliquons l'inhibiteur de la dynamine aux HEK293 exprimant l'APP-GAL4, la libération de l'AICD-GAL4 demeure la même entre le contrôle et le traitement avec le Dynasore (données non présentées), mais la libération est potentialisée par le traitement avec le Dynasore et la Tyrphostin par rapport au traitement avec la Tyrphostin seule (APP+Dynasore+Tyr versus APP+Tyr) (données non présentées). Puisque le clivage de l'APP est séquentiel, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la dynamine pourrait emprisonner l'APP dans les endosomes, puis bien que cet APP puisse être efficacement clivé par la β -secrétase, le clivage par la γ -secrétase ne serait pas affecté. Dans ces conditions, beaucoup de fragments CTF β seraient générés, l'application subséquente de Tyrphostin (Dynasore+Tyrphostin) causerait la forte libération d'AICD-GAL4 observée. Ces résultats sont également inchangés s'il y a coapplication avec l'inhibiteur de l' α -secrétase (données non présentées) indiquant que l' α -secrétase ne joue par un rôle dans ce phénomène.

Ainsi, le clivage produit par la combinaison du jeûne et la perturbation des IR pourrait dépendre de l'activité de la GSK3 de deux façons : tout d'abord, en augmentant l'endocytose de l'APP et de la BACE1 dans les endosomes précoces via l'activation de CaN, puis, en favorisant l'activité de la γ -secrétase. Cependant, les expériences de luciférase et l'observation d'APP taille pleine par WB ne sont pas suffisamment discriminantes pour confirmer cette hypothèse. Pour mieux comprendre les phénomènes observés, il faudrait suivre la formation

de CTF β dans les différentes conditions par WB. L'imagerie nous serait également très utile pour confirmer la localisation des protéines impliquées notamment avec les pHluorins mentionnées plus tôt. De plus, l'utilisation de la VAMP4-pHluorin (de l'anglais *Vesicle-associated membrane protein 4*) pourrait permettre une meilleure compréhension des événements menant à l'augmentation du clivage de l'APP. Il a récemment été proposé que l'utilisation de VAMP4-pHluorin permet l'observation de l'endocytose de masse puisque VAMP4-pHluorin serait recrutée sélectivement dans les larges endosomes de l'endocytose de masse (Nicholson-Fish *et al.*, 2016). Son utilisation pourrait donc permettre d'identifier si notre paradigme de jeûne et de perturbation des IR par la Tyrphostin implique ce type d'endocytose.

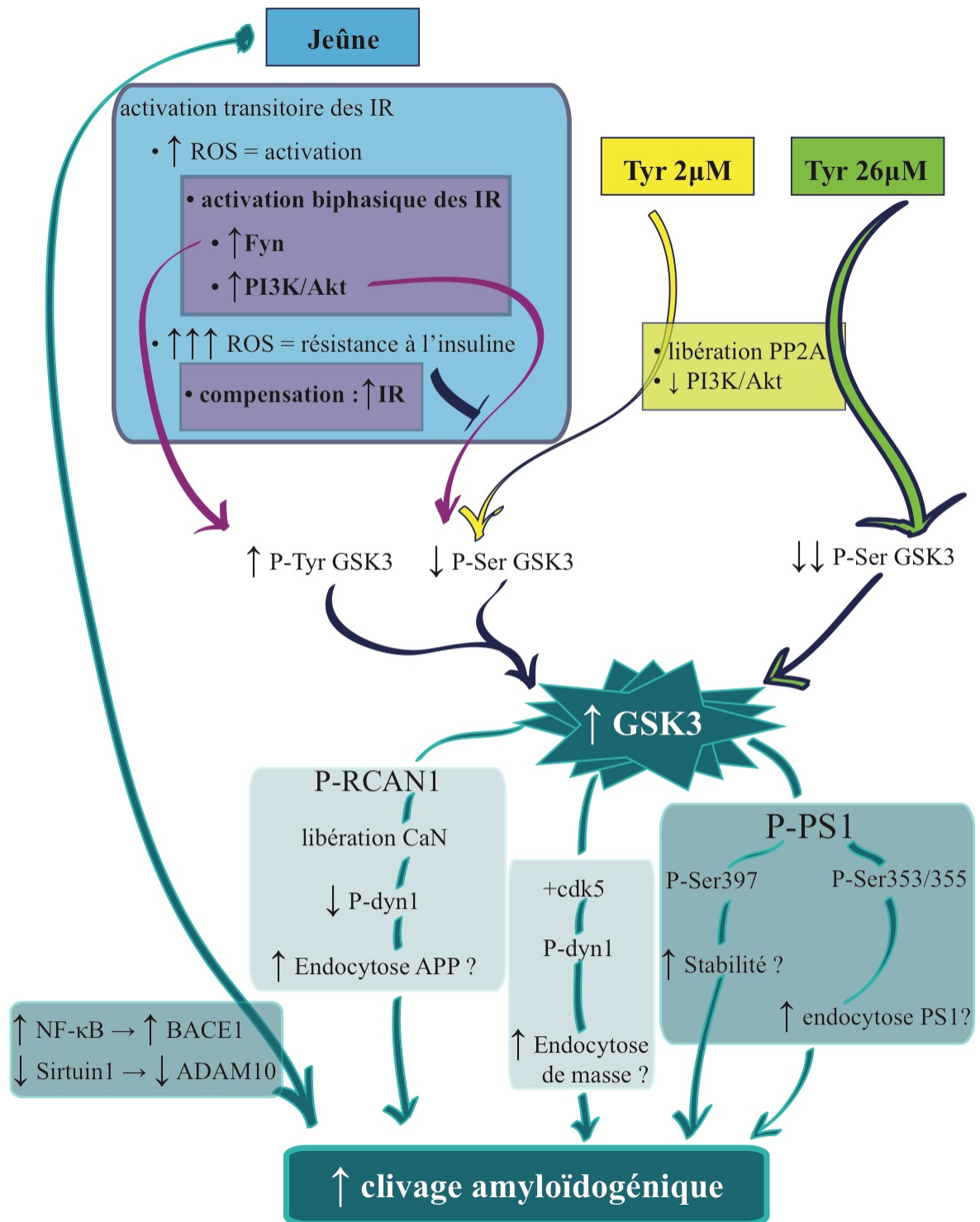


Figure 20. Modèle explicatif de l'activation de la GSK3 par la combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë des IR sur le clivage amyloïdogénique.

Suite du modèle présentée à la Figure 16. Le jeûne peut augmenter la BACE1 et diminuer l'ADAM10 via la NF- κ B et la Sirtuin1 respectivement (Faghihi *et al.*, 2008; O'Connor *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012a; Lee *et al.*, 2014). La GSK3 pourrait également phosphoryler RCAN1 et provoquer l'endocytose de l'APP via la libération de la CaN et la déphosphorylation de la dynamine 1 (Hilioti *et al.*, 2004; Smillie & Cousin, 2011). Aussi, la combinaison de la phosphorylation par la cdk5 et la GSK3 prépare la dynamine 1 pour un cycle d'endocytose de masse, la déphosphorylation subséquente de la dynamin 1 provoque l'endocytose de masse (Clayton *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2010). Finalement, la GSK3 pourrait également phosphoryler la PS1 et potentiellement favoriser sa stabilisation par la phosphorylation de la Ser397 (Kirschenbaum *et al.*, 2001b; Twomey & McCarthy, 2006) et favoriser sa localisation aux endosomes par les phosphorylations aux Ser553/357 (Uemura *et al.*, 2007). Image produite par Sara Licea.

Conclusion

La maladie d'Alzheimer est majoritairement sporadique et n'a pas à ce jour de cause précise connue. Cependant, plusieurs facteurs de risque ont émergé dans les dernières années et le T2D est l'un d'eux. La maladie d'Alzheimer et le T2D ont plusieurs phénotypes en commun, dont la carence énergétique et la résistance à l'insuline. Bien qu'un lien direct ait été établi entre la résistance à l'insuline et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau par la suractivation de la GSK3, l'équivalent pour le clivage de l'APP n'est pas encore aussi bien établi. C'est pourquoi nous avons voulu étudier le rôle de la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline sur le clivage de l'APP. De plus, le cerveau Alzheimer et le cerveau diabétique sont décrits comme étant des cerveaux à jeun. C'est pourquoi nous avons également voulu étudier le rôle du jeûne aigu sur le clivage de l'APP et si ce jeûne vulnérabilise ce clivage à la perturbation de la signalisation de l'insuline. Les recherches faites sur la signalisation de l'insuline et sur la protéolyse de l'APP étudient généralement la perturbation ou l'inhibition chronique sur l'accumulation des produits de clivage de l'APP. À notre connaissance, la combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë de la signalisation de l'insuline dans des cellules n'ayant pas d'APP surexprimé ou mutant n'a pas été étudiée. Tout porte à croire que ces situations pourraient favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer dans un contexte sporadique.

Nous avons montré que la perturbation des IR mène au clivage de l'APP et que le jeûne augmente la vulnérabilité à ce clivage. Cette perturbation cause un clivage par la voie amyloïdogénique. Nous avons également montré que la perturbation des IR est nécessaire alors que la perturbation spécifique des IGF-1R n'est pas suffisante. De plus, ni l'autophagie, ni les caspases et ni le protéasome ne semblent impliqués dans le clivage de l'APP suite à la combinaison du jeûne et de la perturbation des IR. Aussi, nous avons montré que l'activation de la mTOR n'est pas requise alors que celle de la GSK3 est nécessaire au clivage. Finalement, nous avons confirmé dans des cultures primaires neuronales que la combinaison du jeûne et de la perturbation aiguë des IR cause le clivage de l'APP et que la GSK3 est encore une fois suractivée dans ces conditions.

Il reste encore beaucoup à faire pour mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la combinaison du jeûne et de la perturbation de la signalisation de l'insuline. Tout d'abord, il faudrait établir si le jeûne cause la vulnérabilité à la perturbation de la signalisation par une forme d'établissement de résistance à l'insuline. Il serait donc important de vérifier l'état d'activation des IR ainsi que des protéines impliquées dans la cascade de signalisation, notamment IRS-1, PI3K, Akt et GSK3. La combinaison du jeûne et de la perturbation des IR cause une activité aberrante de la GSK3. Il faudrait également établir si le clivage par la voie amyloïdogénique est favorisé dans ces conditions en raison d'une augmentation de l'endocytose de l'APP ainsi qu'une augmentation de l'activité de la γ -secrétase toutes deux favorisées par l'activité aberrante de la GSK3. Il serait utile de confirmer la localisation de l'APP en condition de jeûne ainsi qu'en condition de jeûne avec perturbation des IR. Il faudrait également déterminer si la GSK3 agit sur la PS1 via la phosphorylation de ses sérines, notamment par *knockdown* de la PS1 endogène et transfection d'une PS1 mutante. Ces résultats pourraient élucider la relation entre le T2D et le développement de la maladie d'Alzheimer expliquant moléculairement comment le T2D est un facteur de risque.

Bibliographie

- Abalan, F. (1984) Alzheimer's disease and malnutrition: a new etiological hypothesis. *Medical hypotheses*, **15**, 385-393.
- Abbott, M.-A., Wells, D.G. & Fallon, J.R. (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *The Journal of Neuroscience*, **19**, 7300-7308.
- Adalbert, R., Nogradi, A., Babetto, E., Janeckova, L., Walker, S.A., Kerschensteiner, M., Misgeld, T. & Coleman, M.P. (2009) Severely dystrophic axons at amyloid plaques remain continuous and connected to viable cell bodies. *Brain*, **132**, 402-416.
- Ahmad, W. (2013) Overlapped metabolic and therapeutic links between Alzheimer and diabetes. *Molecular neurobiology*, **47**, 399-424.
- Aizenstein, H.J., Nebes, R.D., Saxton, J.A., Price, J.C., Mathis, C.A., Tsopelas, N.D., Ziolkowski, S.K., James, J.A., Snitz, B.E. & Houck, P.R. (2008) Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Archives of neurology*, **65**, 1509-1517.
- Akintola, A.A. & van Heemst, D. (2015) Insulin, Aging, and the Brain: Mechanisms and Implications. *Frontiers in Endocrinology*, **6**.
- Al-Bassam, J., Ozer, R.S., Safer, D., Halpain, S. & Milligan, R.A. (2002) MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *The Journal of cell biology*, **157**, 1187-1196.
- Alberti, G., Zimmet, P., Shaw, J., Bloomgarden, Z., Kaufman, F. & Silink, M. (2004) Type 2 Diabetes in the Young: The Evolving Epidemic The International Diabetes Federation Consensus Workshop. *Diabetes care*, **27**, 1798-1811.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal*, **15**, 6541.
- Ali, A., Hoeflich, K.P. & Woodgett, J.R. (2001) Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chemical reviews*, **101**, 2527-2540.
- Ali, O. (2010) Type 1 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations *Principles of diabetes mellitus*. Springer, pp. 181-201.

- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J. & Hooper, N.M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein α -secretases. *Journal of neuroscience research*, **74**, 342-352.
- Alzforum (consulté le 5 août 2016) Research Model: Commonly Used Mouse Models.
- Alzforum (consulté le 22 juin 2016) Mutations.
- Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, **64**, 146–148.
- Alzheimer, A., Jarvik, L. & Greenson, H. (1987) About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenson). *Alzheimer disease and associated disorders*, **1**, 3-8.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N. & Murtagh, F.R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, **8**, 429-431.
- Alzheimer Society Canada (consulté le 13 juin 2016) Drugs approved for Alzheimer's disease.
- Alzheimer's Association (2016) 2016 Alzheimer's disease facts and figures *Alzheimer's & Dementia*, pp. 459-509.
- Alzheimer's Disease International (2015) World Alzheimer Report.
- Amtul, Z., Uhrig, M., Rozmahel, R.F. & Beyreuther, K. (2011) Structural insight into the differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on the production of A β peptides and amyloid plaques. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 6100-6107.
- Anand, R., Gill, K.D. & Mahdi, A.A. (2014) Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, **76 Pt A**, 27-50.
- Anarkooli, I.J., Sankian, M., Vahedi, F., Bonakdaran, S., Varasteh, A.-R. & Haghiri, H. (2009) Evaluation of insulin and ascorbic acid effects on expression of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activity in hippocampus of STZ-induced diabetic rats. *Cellular and molecular neurobiology*, **29**, 133-140.
- Anchisi, D., Borroni, B., Franceschi, M., Kerrouche, N., Kalbe, E., Beuthien-Beumann, B., Cappa, S., Lenz, O., Ludecke, S. & Marcone, A. (2005) Heterogeneity of brain glucose metabolism in mild cognitive impairment and clinical progression to Alzheimer disease. *Archives of neurology*, **62**, 1728-1733.
- Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., Warter, J., Brice, A., Campion, D., Frebourg, T. & Checler, F. (1999) Unusual phenotypic alteration of β amyloid precursor protein (β APP) maturation by a new Val-715 \rightarrow Met β APP-770 mutation responsible for

probable early-onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 4119-4124.

Anderson, J.W., Kendall, C.W. & Jenkins, D.J. (2003) Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies. *Journal of the American college of nutrition*, **22**, 331-339.

Ando, K., Iijima, K.-i., Elliott, J.I., Kirino, Y. & Suzuki, T. (2001) Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of β -amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 40353-40361.

Ankarcrona, M., Winblad, B., Monteiro, C., Fearn, C., Powers, E., Johansson, J., Westermarck, G., Presto, J., Ericzon, B.G. & Kelly, J. (2016) Current and future treatment of amyloid diseases. *Journal of internal medicine*.

Aplin, A.E., Gibb, G.M., Jacobsen, J.S., Gallo, J.M. & Anderton, B.H. (1996) In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3 β . *Journal of neurochemistry*, **67**, 699-707.

Arendash, G.W., Gordon, M.N., Diamond, D.M., Austin, L.A., Hatcher, J.M., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D. & Morgan, D. (2001a) Behavioral Assessment of Alzheimer's Transgenic Mice Following Long-Term A β Vaccination: Task Specificity and Correlations between A β Deposition and Spatial Memory. *DNA and cell biology*, **20**, 737-744.

Arendash, G.W., King, D.L., Gordon, M.N., Morgan, D., Hatcher, J.M., Hope, C.E. & Diamond, D.M. (2001b) Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain research*, **891**, 42-53.

Arendash, G.W., Lewis, J., Leighty, R.E., McGowan, E., Cracchiolo, J.R., Hutton, M. & Garcia, M.F. (2004) Multi-metric behavioral comparison of APP^{sw} and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain research*, **1012**, 29-41.

Armstrong, J., Boada, M., Rey, M., Vidal, N. & Ferrer, I. (2004) Familial Alzheimer disease associated with A713T mutation in APP. *Neuroscience letters*, **370**, 241-243.

Arnold, S.E., Lucki, I., Brookshire, B.R., Carlson, G.C., Browne, C.A., Kazi, H., Bang, S., Choi, B.R., Chen, Y., McMullen, M.F. & Kim, S.F. (2014) High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis*, **67**, 79-87.

Arosio, P., Vendruscolo, M., Dobson, C.M. & Knowles, T.P. (2014) Chemical kinetics for drug discovery to combat protein aggregation diseases. *Trends in pharmacological sciences*, **35**, 127-135.

- Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A. & Bennett, D.A. (2004) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Archives of neurology*, **61**, 661-666.
- Astbury, W.T., Dickinson, S. & Bailey, K. (1935) The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochemical Journal*, **29**, 2351.
- Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S. & Quirion, R. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*, **68**, 209-245.
- Aulston, B.D., Odero, G.L., Glazner, G.W. & Aboud, Z. (2013) *Alzheimer's Disease and Diabetes*. INTECH Open Access Publisher.
- Babri, S., Badie, H.G., Khamenei, S. & Ordikhani-Seyedlar, M. (2007) Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. *Brain and cognition*, **64**, 86-91.
- Baillyes, E.M., Hayward, A.C. & Siddle, K. (1997) Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochemical Journal*, **327**, 209-215.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., Mclauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R. & Cohen, P. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochemical Journal*, **408**, 297-315.
- Bale, R. (1973) Brain damage in diabetes mellitus. *The British Journal of Psychiatry*, **122**, 337-341.
- Ballatore, C., Lee, V.M.-Y. & Trojanowski, J.Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, **8**, 663-672.
- Bar, R.S., Gorden, P., Roth, J., Kahn, C.R. & De Meyts, P. (1976) Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients: effects of starvation, refeeding, and dieting. *Journal of Clinical Investigation*, **58**, 1123.
- Barnes, N.Y., Li, L., Yoshikawa, K., Schwartz, L.M., Oppenheim, R.W. & Milligan, C.E. (1998) Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons. *The Journal of neuroscience*, **18**, 5869-5880.
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X. & Blazey, T.M. (2012) Clinical and biomarker changes in

- dominantly inherited Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, **367**, 795-804.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. & Vigneri, R. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine reviews*, **30**, 586-623.
- Belyaev, N.D., Kellett, K.A., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M. & Turner, A.J. (2010) The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β -secretase-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 41443-41454.
- Benedict, C., Frey, W.H., Schiöth, H.B., Schultes, B., Born, J. & Hallschmid, M. (2011) Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Experimental gerontology*, **46**, 112-115.
- Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.-C., Curran, E., Citron, M. & Vassar, R. (2000a) Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 20647-20651.
- Bennett, R.G., Duckworth, W.C. & Hamel, F.G. (2000b) Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36621-36625.
- Berridge, M.J. (2010) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflügers Arch*, **459**, 441-449.
- Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M.G., Go, R.C. & Vekrellis, K. (2000) Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*, **290**, 2302-2303.
- Beurel, E., Grieco, S.F. & Jope, R.S. (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics*, **148**, 114-131.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L. & LaFerla, F.M. (2005) Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, **45**, 675-688.
- Blauwendraat, C., Wilke, C., Jansen, I.E., Schulte, C., Simón-Sánchez, J., Metzger, F.G., Bender, B., Gasser, T., Maetzler, W. & Rizzu, P. (2016) Pilot whole-exome sequencing of a German early-onset Alzheimer's disease cohort reveals a substantial frequency of PSEN2 variants. *Neurobiology of aging*, **37**, 208. e211-208. e217.
- Bliss, T.V.P. & Cooke, S.F. (2011) Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics*, **66**, 3-17.

- Bloomgarden, Z.T. (2004) Type 2 Diabetes in the Young The evolving epidemic. *Diabetes care*, **27**, 998-1010.
- Boden, G. (1997) Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, **46**, 3-10.
- Bojarski, L., Herms, J. & Kuznicki, J. (2008) Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, **52**, 621-633.
- Bomfim, T.R., Forny-Germano, L., Sathler, L.B., Brito-Moreira, J., Houzel, J.-C., Decker, H., Silverman, M.A., Kazi, H., Melo, H.M. & McClean, P.L. (2012) An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *The Journal of clinical investigation*, **122**, 1339-1353.
- Boncristiano, S., Calhoun, M.E., Howard, V., Bondolfi, L., Kaeser, S.A., Wiederhold, K.-H., Staufenbiel, M. & Jucker, M. (2005) Neocortical synaptic bouton number is maintained despite robust amyloid deposition in APP23 transgenic mice. *Neurobiology of aging*, **26**, 607-613.
- Borchelt, D.R., Ratovitski, T., Van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L. & Sisodia, S.S. (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, **19**, 939-945.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.-M., Kim, G., Seekins, S. & Yager, D. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, **17**, 1005-1013.
- Boucher, J., Kleinriders, A. & Kahn, C.R. (2014) Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **6**, a009191.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H. & Del Tredici, K. (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta neuropathologica*, **112**, 389-404.
- Braak, H. & Braak, E. (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, **82**, 239-259.
- Braak, H., Thal, D.R., Ghebremedhin, E. & Del Tredici, K. (2011) Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **70**, 960-969.

- Brandt, R. & Lee, G. (1993) The balance between τ protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *Journal of neurochemistry*, **61**, 997-1005.
- Brenner, H. & Arndt, V. (2004) Epidemiology in aging research. *Experimental gerontology*, **39**, 679-686.
- Brown, L.M., Clegg, D.J., Benoit, S.C. & Woods, S.C. (2006) Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiology & behavior*, **89**, 687-691.
- Buée, L., Bussiere, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P.R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, **33**, 95-130.
- Bugiani, O., Giaccone, G., Rossi, G., Mangieri, M., Capobianco, R., Morbin, M., Mazzoleni, G., Cupidi, C., Marcon, G. & Giovagnoli, A. (2010) Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Archives of neurology*, **67**, 987-995.
- Bulawa, C.E., Connelly, S., DeVit, M., Wang, L., Weigel, C., Fleming, J.A., Packman, J., Powers, E.T., Wiseman, R.L. & Foss, T.R. (2012) Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 9629-9634.
- Buss, H., Dörrie, A., Schmitz, M.L., Frank, R., Livingstone, M., Resch, K. & Kracht, M. (2004) Phosphorylation of serine 468 by GSK-3 β negatively regulates basal p65 NF- κ B activity. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 49571-49574.
- Cacace, R., Slegers, K. & Van Broeckhoven, C. (2016) Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, **12**, 733-748.
- Canadian Diabetes Association (consulté le 13 juin 2016) Types of Diabetes.
- Canevari, L. & Clark, J.B. (2007) Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochemical research*, **32**, 739-750.
- Cao, D., Lu, H., Lewis, T.L. & Li, L. (2007) Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 36275-36282.
- Capell, A., Meyn, L., Fluhrer, R., Teplow, D.B., Walter, J. & Haass, C. (2002) Apical sorting of β -secretase limits amyloid β -peptide production. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 5637-5643.

- Carey, R.M., Balcz, B.A., Lopez-Coviella, I. & Slack, B.E. (2005) Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid β protein. *BMC cell biology*, **6**, 1.
- Carey, R.M., Blusztajn, J.K. & Slack, B.E. (2011) Surface expression and limited proteolysis of ADAM10 are increased by a dominant negative inhibitor of dynamin. *BMC cell biology*, **12**, 1.
- Carroll, J.C., Rosario, E.R., Chang, L., Stanczyk, F.Z., Oddo, S., LaFerla, F.M. & Pike, C.J. (2007) Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *The Journal of Neuroscience*, **27**, 13357-13365.
- Carter, D., Desmarais, E., Bellis, M., Campion, D., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Agid, Y., Jaillard-Serradt, A. & Mallet, J. (1992) More missense in amyloid gene. *Nature genetics*, **2**, 255-256.
- Cedazo-Mínguez, A., Popescu, B., Blanco-Millán, J., Akterin, S., Pei, J.J., Winblad, B. & Cowburn, R. (2003) Apolipoprotein E and β -amyloid (1–42) regulation of glycogen synthase kinase-3 β . *Journal of neurochemistry*, **87**, 1152-1164.
- Chamany, S. & Tabaei, B.P. (2010) Epidemiology *Principles of diabetes mellitus*. Springer, pp. 117-127.
- Chami, B., Steel, A.J., De La Monte, S.M. & Sutherland, G.T. (2016) The rise and fall of insulin signaling in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis*, **31**, 497-515.
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T. & Hyman, B.T. (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature neuroscience*, **2**, 271-276.
- Chartier-Harlin, M.-C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P. & Hardy, J. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature*, **353**, 844-846.
- Chen, C.-H., Zhou, W., Liu, S., Deng, Y., Cai, F., Tone, M., Tone, Y., Tong, Y. & Song, W. (2012a) Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **15**, 77-90.
- Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D. & Freedman, S.B. (2000) A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, **408**, 975-979.

- Chen, W.-J., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 3116-3123.
- Chen, W.-T., Hong, C.-J., Lin, Y.-T., Chang, W.-H., Huang, H.-T., Liao, J.-Y., Chang, Y.-J., Hsieh, Y.-F., Cheng, C.-Y. & Liu, H.-C. (2012b) Amyloid-beta (A β) D7H mutation increases oligomeric A β 42 and alters properties of A β -zinc/copper assemblies. *PLoS One*, **7**, e35807.
- Chen, Y., Deng, Y., Zhang, B. & Gong, C.-X. (2014) Deregulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease. *Neuroscience bulletin*, **30**, 282-294.
- Chen, Y., Liang, Z., Blanchard, J., Dai, C.-L., Sun, S., Lee, M.H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Liu, F. & Gong, C.-X. (2013) A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). *Molecular neurobiology*, **47**, 711-725.
- Cheng, I.H., Scarce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J.J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puoliväli, J., Lesné, S., Ashe, K.H. & Muchowski, P.J. (2007) Accelerating amyloid- β fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 23818-23828.
- Chishti, M.A., Yang, D.-S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J. & French, J. (2001) Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 21562-21570.
- Chiti, F. & Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333-366.
- Cho, J.H. & Johnson, G.V. (2004) Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *Journal of neurochemistry*, **88**, 349-358.
- Choi, S.H., Kim, Y.H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C., Chen, H., Hooli, B., Asselin, C. & Muffat, J. (2014) A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*, **515**, 274-278.
- Cholerton, B., Baker, L.D. & Craft, S. (2011) Insulin resistance and pathological brain ageing. *Diabetic Medicine*, **28**, 1463-1475.
- Ciaraldi, T., Nikoulina, S. & Henry, R. (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance in Type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, **16**, 69-71.

- Clarke, D.W., Mudd, L., Boyd, F.T., Fields, M. & Raizada, M.K. (1986) Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. *Journal of neurochemistry*, **47**, 831-836.
- Clariss, H., Key, B., Beyreuther, K., Masters, C. & Small, D. (1995) Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Developmental brain research*, **88**, 87-95.
- Clayton, E.L., Anggono, V., Smillie, K.J., Chau, N., Robinson, P.J. & Cousin, M.A. (2009) The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 7706-7717.
- Clayton, E.L., Sue, N., Smillie, K.J., O'Leary, T., Bache, N., Cheung, G., Cole, A.R., Wyllie, D.J., Sutherland, C. & Robinson, P.J. (2010) Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nature neuroscience*, **13**, 845-851.
- Clinton, L.K., Billings, L.M., Green, K.N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J.L. & LaFerla, F.M. (2007) Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of disease*, **28**, 76-82.
- Cohen, A.D. & Klunk, W.E. (2014) Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiology of disease*, **72**, 117-122.
- Cohlberg, J.A., Li, J., Uversky, V.N. & Fink, A.L. (2002) Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from α -synuclein in vitro. *Biochemistry*, **41**, 1502-1511.
- Cole, A., Frame, S. & Cohen, P. (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochemical Journal*, **377**, 249.
- Convit, A., De Leon, M., Tarshish, C., De Santi, S., Tsui, W., Rusinek, H. & George, A. (1997) Specific hippocampal volume reductions in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, **18**, 131-138.
- Corcoran, K.A., Lu, Y., Turner, R.S. & Maren, S. (2002) Overexpression of hAPPswe impairs rewarded alternation and contextual fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Learning & Memory*, **9**, 243-252.
- Corder, E., Saunders, A., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Small, G., Roses, A.D., Haines, J. & Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, **261**, 921-923.
- Craft, S. (2009) The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Archives of neurology*, **66**, 300-305.

- Craft, S., Asthana, S., Cook, D.G., Baker, L.D., Cherrier, M., Purganan, K., Wait, C., Petrova, A., Latendresse, S. & Watson, G.S. (2003) Insulin dose–response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer’s disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology*, **28**, 809-822.
- Craft, S., Asthana, S., Newcomer, J.W., Wilkinson, C.W., Matos, I.T., Baker, L.D., Cherrier, M., Lofgreen, C., Latendresse, S. & Petrova, A. (1999) Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Archives of general psychiatry*, **56**, 1135-1140.
- Craft, S., Baker, L.D., Montine, T.J., Minoshima, S., Watson, G.S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E. & Plymate, S.R. (2012) Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Archives of neurology*, **69**, 29-38.
- Craft, S., Cholerton, B. & Baker, L.D. (2013) Insulin and Alzheimer's disease: untangling the web. *Journal of Alzheimer's Disease*, **33**.
- Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., Dagogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., Luby, J., Dagogo-Jack, A. & Alderson, A. (1996) Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, **17**, 123-130.
- Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., Lee, C.D., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D. & James, M.J. (2012) ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *science*, **335**, 1503-1506.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.
- Cruts, M., Dermaut, B., Rademakers, R., Broeck, M.V.d., Stögbauer, F. & Broeckhoven, C.V. (2003) Novel APP mutation V715A associated with presenile Alzheimer’s disease in a German family. *Journal of neurology*, **250**, 1374-1375.
- Das, P., Murphy, M.P., Younkin, L.H., Younkin, S.G. & Golde, T.E. (2001) Reduced effectiveness of A β 1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition. *Neurobiology of aging*, **22**, 721-727.
- Dawkins, E. & Small, D.H. (2014) Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, **129**, 756-769.
- Dawson, G., Seabrook, G., Zheng, H., Smith, D., Graham, S., O'dowd, G., Bowery, B., Boyce, S., Trumbauer, M. & Chen, H. (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience*, **90**, 1-13.

- De La Monte, S.M. (2009) Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB reports*, **42**, 475.
- De La Monte, S.M. & Wands, J.R. (2008) Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. *Journal of diabetes science and technology*, **2**, 1101-1113.
- De Meyts, P. & Whittaker, J. (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**, 769-783.
- De Strooper, B. (2003) Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron*, **38**, 9-12.
- De Strooper, B., Craessaerts, K., Dewachter, I., Moechars, D., Greenberg, B., Van Leuven, F. & Van Den Berghe, H. (1995) Basolateral secretion of amyloid precursor protein in Madin-Darby canine kidney cells is disturbed by alterations of intracellular pH and by introducing a mutation associated with familial Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 4058-4065.
- Demarchi, F., Bertoli, C., Sandy, P. & Schneider, C. (2003) Glycogen synthase kinase-3 β regulates NF- κ B1/p105 stability. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 39583-39590.
- Devi, L., Alldred, M.J., Ginsberg, S.D. & Ohno, M. (2012) Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, **7**, e32792.
- Di Fede, G., Catania, M., Morbin, M., Rossi, G., Suardi, S., Mazzoleni, G., Merlin, M., Giovagnoli, A.R., Prioni, S. & Erbetta, A. (2009) A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science*, **323**, 1473-1477.
- Dickson, D.W. (1997) The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **56**, 321-339.
- Doble, B.W., Patel, S., Wood, G.A., Kockeritz, L.K. & Woodgett, J.R. (2007) Functional redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell*, **12**, 957-971.
- Doherty, J.-J., Kay, D.G., Lai, W.H., Posner, B.I. & Bergeron, J. (1990) Selective degradation of insulin within rat liver endosomes. *The Journal of cell biology*, **110**, 35-42.
- Donaldson, J.G., Porat-Shliom, N. & Cohen, L.A. (2009) Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular signalling*, **21**, 1-6.
- Dries, D.R. & Yu, G. (2008) Assembly, maturation, and trafficking of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, **5**, 132.

- Drzezga, A., Grimmer, T., Riemenschneider, M., Lautenschlager, N., Siebner, H., Alexopoulos, P., Minoshima, S., Schwaiger, M. & Kurz, A. (2005) Prediction of individual clinical outcome in MCI by means of genetic assessment and 18F-FDG PET. *Journal of Nuclear Medicine*, **46**, 1625-1632.
- Du, H., Guo, L., Zhang, W., Rydzewska, M. & Yan, S. (2011) Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiology of aging*, **32**, 398-406.
- Duarte, A.I., Proença, T., Oliveira, C.R., Santos, M.S. & Rego, A.C. (2006) Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes*, **55**, 2863-2870.
- Duarte, A.I., Santos, P., Oliveira, C.R., Santos, M.S. & Rego, A.C. (2008) Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 β signaling pathways and changes in protein expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1783**, 994-1002.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P.J. & Scheltens, P. (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*, **6**, 734-746.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.-M., Perez-Tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y. & Yager, D. (1996) Increased amyloid- β 42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, **383**, 710-713.
- Dumont, M., Strazielle, C., Staufenbiel, M. & Lalonde, R. (2004) Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain research*, **1024**, 113-121.
- Dunning, C.J., McGauran, G., Willén, K., Gouras, G.K., O'Connell, D.J. & Linse, S. (2015) Direct High Affinity Interaction between A β 42 and GSK3 α Stimulates Hyperphosphorylation of Tau. A New Molecular Link in Alzheimer's Disease? *ACS chemical neuroscience*.
- Dwyer, D.S., Vannucci, S.J. & Simpson, I.A. (2002) Expression, regulation, and functional role of glucose transporters (GLUTs) in brain. *International review of neurobiology*, **159**, 159-188.
- e Silva, E.F.d.C. & e Silva, O.A.d.C. (2003) Protein phosphorylation and APP metabolism. *Neurochemical research*, **28**, 1553-1561.

- Earnest, M.P., Heaton, R.K., Wilkinson, W.E. & Manke, W.F. (1979) Cortical atrophy, ventricular enlargement and intellectual impairment in the aged. *Neurology*, **29**, 1138-1138.
- Eckel, R.H., Grundy, S.M. & Zimmet, P.Z. (2005) The metabolic syndrome. *The Lancet*, **365**, 1415-1428.
- Eckman, C.B., Mehta, N.D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., Graff-Radford, N., Hinder, P., Yager, D. & Zenk, B. (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A β 42 (43). *Human molecular genetics*, **6**, 2087-2089.
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H. & Haass, C. (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the β -amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 13389-13393.
- Eisenberg, D. (2003) The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 11207-11210.
- Eisenberg, D. & Jucker, M. (2012) The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, **148**, 1188-1203.
- Eldar-Finkelman, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends in molecular medicine*, **8**, 126-132.
- Eldar-Finkelman, H., Argast, G.M., Foord, O., Fischer, E.H. & Krebs, E.G. (1996) Expression and characterization of glycogen synthase kinase-3 mutants and their effect on glycogen synthase activity in intact cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 10228-10233.
- Eldar-Finkelman, H. & Krebs, E.G. (1997) Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 9660-9664.
- Eldar-Finkelman, H., Schreyer, S.A., Shinohara, M.M., LeBoeuf, R.C. & Krebs, E.G. (1999) Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes-and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes*, **48**, 1662-1666.
- Ellis, R., Olichney, J., Thal, L., Mirra, S., Morris, J., Beekly, D. & Heyman, A. (1996) Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease The CERAD experience, part XV. *Neurology*, **46**, 1592-1596.
- Embi, N., Rylatt, D.B. & Cohen, P. (1980) Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry*, **107**, 519-527.

- Erecińska, M., Zaleska, M.M., Nissim, I., Nelson, D., Dagani, F. & Yudkoff, M. (1988) Glucose and synaptosomal glutamate metabolism: studies with [15N] glutamate. *Journal of neurochemistry*, **51**, 892-902.
- Erol, A. (2008) An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, **13**, 241-253.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D. & Ward, P.J. (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, **248**, 1122-1124.
- Esparza, T.J., Zhao, H., Cirrito, J.R., Cairns, N.J., Bateman, R.J., Holtzman, D.M. & Brody, D.L. (2013) Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Annals of neurology*, **73**, 104-119.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A. & Grodsky, G.M. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews*, **23**, 599-622.
- Fagan, A.M., Mintun, M.A., Mach, R.H., Lee, S.-Y., Dence, C.S., Shah, A.R., LaRossa, G.N., Spinner, M.L., Klunk, W.E., Mathis, C.A., DeKosky, S.T., Morris, J.C. & Holtzman, D.M. (2006) Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β 42 in humans. *Annals of Neurology*, **59**, 512-519.
- Faghihi, M.A., Modarresi, F., Khalil, A.M., Wood, D.E., Sahagan, B.G., Morgan, T.E., Finch, C.E., Laurent III, G.S., Kenny, P.J. & Wahlestedt, C. (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of β -secretase. *Nature medicine*, **14**, 723-730.
- Fakhrai-Rad, H., Nikoshkov, A., Kamel, A., Fernström, M., Zierath, J.R., Norgren, S., Luthman, H. & Galli, J. (2000) Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Human Molecular Genetics*, **9**, 2149-2158.
- Fang, F., Chen, X., Huang, T., Lue, L.-F., Luddy, J.S. & Yan, S.S. (2012) Multi-faced neuroprotective effects of Ginsenoside Rg1 in an Alzheimer mouse model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1822**, 286-292.
- Farlow, M.R., Miller, M.L. & Pejovic, V. (2008) Treatment options in Alzheimer's disease: maximizing benefit, managing expectations. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **25**, 408-422.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N. & van Duijn, C.M. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Jama*, **278**, 1349-1356.

- Farris, W., Mansourian, S., Leissring, M.A., Eckman, E.A., Bertram, L., Eckman, C.B., Tanzi, R.E. & Selkoe, D.J. (2004) Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid β -protein. *The American journal of pathology*, **164**, 1425-1434.
- Fayed, N., Modrego, P.J., Rojas-Salinas, G. & Aguilar, K. (2011) Brain glutamate levels are decreased in Alzheimer's disease: a magnetic resonance spectroscopy study. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, **26**, 450-456.
- Federici, M., Porzio, O., Lauro, D., Borboni, P., Giovannone, B., Zucaro, L., Hribal, M.L. & Sesti, G. (1998) Increased Abundance of Insulin/Insulin-Like Growth Factor-I Hybrid Receptors in Skeletal Muscle of Obese Subjects Is Correlated with In Vivo Insulin Sensitivity 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **83**, 2911-2915.
- Ferrari, A., Hoernkli, F., Baechi, T., Nitsch, R.M. & Götz, J. (2003) beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem*, **278**, 40162-40168.
- Ferreira, I.A., Mocking, A.I., Urbanus, R.T., Varlack, S., Wnuk, M. & Akkerman, J.-W.N. (2005) Glucose uptake via glucose transporter 3 by human platelets is regulated by protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 32625-32633.
- Finch, C.E. & Cohen, D.M. (1997) Aging, metabolism, and Alzheimer disease: review and hypotheses. *Experimental neurology*, **143**, 82-102.
- Floresan, C., Zampese, E., Zanese, M., Brunello, L., Ichas, F., De Giorgi, F. & Pizzo, P. (2008) High content analysis of gamma-secretase activity reveals variable dominance of presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*, **1783**, 1551-1560.
- Floyd, R.A. (1999) Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1346-1355.
- Fonseca, V. & John-Kalarickal, J. (2010) Type 2 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations *Principles of diabetes mellitus*. Springer, pp. 202-220.
- Fossati, S., Cam, J., Meyerson, J., Mezhericher, E., Romero, I., Couraud, P., Weksler, B., Ghiso, J. & Rostagno, A. (2010) Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid- β variants in cells composing the cerebral vessel walls. *The FASEB Journal*, **24**, 229-241.
- Fox, N.C., Scahill, R.I., Crum, W.R. & Rossor, M.N. (1999) Correlation between rates of brain atrophy and cognitive decline in AD. *Neurology*, **52**, 1687-1689.

- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M. & Wilcock, G.K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **66**, 137-147.
- Freude, S., Schilbach, K. & Schubert, M. (2009) The role of IGF-1 receptor and insulin receptor signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: from model organisms to human disease. *Current Alzheimer Research*, **6**, 213-223.
- Fröjdö, S., Vidal, H. & Pirola, L. (2009) Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1792**, 83-92.
- Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.-G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Türk, A. & Hoyer, S. (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, **105**, 423-438.
- Fuertes, G., De Llano, J.J.M., Villarroja, A., Rivett, A.J. & Knecht, E. (2003) Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochemical Journal*, **375**, 75-86.
- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T. & Irizarry, M.C. (2002) β -Secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of neurology*, **59**, 1381-1389.
- Fukuyama, H., Ogawa, M., Yamauchi, H., Yamaguchi, S., Kimura, J., Yonekura, Y. & Konishi, J. (1994) Altered cerebral energy metabolism in Alzheimer's disease: a PET study. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, **35**, 1-6.
- Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L.B., Matsudaira, P. & Yankner, B.A. (1994) Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 13623-13628.
- Gadi, R. & Samaha, F.F. (2007) Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Current diabetes reports*, **7**, 228-234.
- Galimberti, D. & Scarpini, E. (2016) Emerging amyloid disease-modifying drugs for Alzheimer's disease. *Expert opinion on emerging drugs*, **21**, 5-7.
- Galvan, V., Chen, S., Lu, D., Logvinova, A., Goldsmith, P., Koo, E.H. & Bredesen, D.E. (2002) Caspase cleavage of members of the amyloid precursor family of proteins. *Journal of neurochemistry*, **82**, 283-294.

- Galvan, V., Gorostiza, O.F., Banwait, S., Ataie, M., Logvinova, A.V., Sitaraman, S., Carlson, E., Sagi, S.A., Chevallier, N. & Jin, K. (2006) Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 7130-7135.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Borthellette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T. & Gillespie, F. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein.
- Gasparini, L., Benussi, L., Bianchetti, A., Binetti, G., Curti, D., Govoni, S., Moraschi, S., Racchi, M. & Trabucchi, M. (1999) Energy metabolism inhibition impairs amyloid precursor protein secretion from Alzheimer's fibroblasts. *Neuroscience letters*, **263**, 197-200.
- Gasparini, L., Racchi, M., Benussi, L., Curti, D., Binetti, G., Bianchetti, A., Trabucchi, M. & Govoni, S. (1997) Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells. *Neuroscience letters*, **231**, 113-117.
- Gatenby, V.K. & Kearney, M.T. (2010) The role of IGF-1 resistance in obesity and type 2 diabetes-mellitus-related insulin resistance and vascular disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, **14**, 1333-1342.
- Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M. & Shearman, M.S. (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- β precursor protein and amyloidogenic A β peptide formation. *Cell*, **97**, 395-406.
- Ghidoni, R., Albertini, V., Squitti, R., Paterlini, A., Bruno, A., Bernardini, S., Cassetta, E., Rossini, P.M., Squitieri, F. & Benussi, L. (2009) Novel T719P A β PP mutation unbalances the relative proportion of amyloid- β peptides. *Journal of Alzheimer's Disease*, **18**, 295-303.
- Ghosh, S. & Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, **109**, S81-S96.
- Gimenez-Llort, L., Blazquez, G., Canete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobena, A., LaFerla, F.M. & Fernandez-Teruel, A. (2007) Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **31**, 125-147.
- Girnita, A., Girnita, L., del Prete, F., Bartolazzi, A., Larsson, O. & Axelson, M. (2004) Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer research*, **64**, 236-242.

- Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and biophysical research communications*, **122**, 1131-1135.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N. & James, L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, **349**, 704-706.
- Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., Rutherford, D. & Crowther, R. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, **3**, 519-526.
- Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J. & Younkin, S.G. (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, **255**, 728-730.
- Good, C.D., Johnsrude, I.S., Ashburner, J., Henson, R.N., Fristen, K. & Frackowiak, R.S. (Year) A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. Biomedical Imaging, 2002. 5th IEEE EMBS International Summer School on. IEEE, City. p. 16 pp.
- Görtz, N., Lewejohann, L., Tamm, M., Ambrée, O., Keyvani, K., Paulus, W. & Sachser, N. (2008) Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behavioural brain research*, **191**, 43-48.
- Götz, J., Probst, A., Spillantini, M.G., Schäfer, T., Jakes, R., Bürki, K. & Goedert, M. (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *The EMBO journal*, **14**, 1304.
- Götz, J., Streffer, J., David, D., Schild, A., Hoernkli, F., Pennanen, L., Kurosinski, P. & Chen, F. (2004) Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Molecular psychiatry*, **9**, 664-683.
- Gowing, E., Roher, A.E., Woods, A.S., Cotter, R.J., Chaney, M., Little, S.P. & Ball, M.J. (1994) Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 10987-10990.
- Grabowski, T.J., Cho, H.S., Vonsattel, J.P.G., Rebeck, G.W. & Greenberg, S.M. (2001) Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Annals of neurology*, **49**, 697-705.
- Grant, B.D. & Donaldson, J.G. (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*, **10**, 597-608.

- Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A. & Cataldo, A.M. (2003) Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular β -cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and A β production. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 31261-31268.
- Green, K.N. & LaFerla, F.M. (2008) Linking calcium to A β and Alzheimer's disease. *Neuron*, **59**, 190-194.
- Greenwood, C.E. & Winocur, G. (2001) Glucose treatment reduces memory deficits in young adult rats fed high-fat diets. *Neurobiology of learning and memory*, **75**, 179-189.
- Groemer, T.W., Thiel, C.S., Holt, M., Riedel, D., Hua, Y., Hüve, J., Wilhelm, B.G. & Klingauf, J. (2011) Amyloid precursor protein is trafficked and secreted via synaptic vesicles. *PLoS One*, **6**, e18754.
- Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P. & Hoyer, S. (2007) Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *Journal of neurochemistry*, **101**, 757-770.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S. & Wisniewski, H.M. (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, **261**, 6084-6089.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M. & Binder, L.I. (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4913-4917.
- Guerreiro, R.J., Baquero, M., Blesa, R., Boada, M., Brás, J.M., Bullido, M.J., Calado, A., Crook, R., Ferreira, C. & Frank, A. (2010) Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiology of aging*, **31**, 725-731.
- Guest, G.M. (1964) The Story of Insulin: Forty Years of Success Against Diabetes. *American Journal of Diseases of Children*, **107**, 107-107.
- Guo, Q., Fu, W., Sopher, B.L., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M. & Mattson, M.P. (1999) Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nature medicine*, **5**, 101-106.
- Gupta-Bansal, R., Frederickson, R.C. & Brunden, K.R. (1995) Proteoglycan-mediated Inhibition of A β Proteolysis A POTENTIAL CAUSE OF SENILE PLAQUE ACCUMULATION. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 18666-18671.

- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M., Teplow, D.B. & Selkoe, D.J. (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 3021-3024.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**, a006270.
- Haass, C., Koo, E.H., Capell, A., Teplow, D.B. & Selkoe, D.J. (1995a) Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. *The Journal of cell biology*, **128**, 537-547.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y. & Selkoe, D.J. (1992) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, **357**, 500-503.
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. & Selkoe, D.J. (1995b) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature medicine*, **1**, 1291-1296.
- Haass, C. & Mandelkow, E. (2010) Fyn-tau-amyloid: a toxic triad. *Cell*, **142**, 356-358.
- Haass, C. & Selkoe, D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature reviews Molecular cell biology*, **8**, 101-112.
- Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.-P. & Anderton, B.H. (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neuroscience letters*, **147**, 58-62.
- Hanna, A., Horne, P., Yager, D., Eckman, C., Eckman, E. & Janus, C. (2009) Amyloid β and impairment in multiple memory systems in older transgenic APP TgCRND8 mice. *Genes, Brain and Behavior*, **8**, 676-684.
- Hård, T. & Lendel, C. (2012) Inhibition of amyloid formation. *Journal of molecular biology*, **421**, 441-465.
- Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences*, **20**, 154-159.
- Hardy, J. & Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*, **297**, 353-356.
- Hardy, J.A. & Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, **256**, 184.

- Harris, M.I. (1991) Hypercholesterolemia in diabetes and glucose intolerance in the US population. *Diabetes care*, **14**, 366-374.
- Hartman, R.E., Izumi, Y., Bales, K.R., Paul, S.M., Wozniak, D.F. & Holtzman, D.M. (2005) Treatment with an amyloid- β antibody ameliorates plaque load, learning deficits, and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience*, **25**, 6213-6220.
- Hasebe, N., Fujita, Y., Ueno, M., Yoshimura, K., Fujino, Y. & Yamashita, T. (2013) Soluble β -amyloid precursor protein alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PloS one*, **8**, e82321.
- Havrankova, J., Roth, J. & Brownstein, M. (1978a) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat.
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J. & Brownstein, M. (1978b) Identification of insulin in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **75**, 5737-5741.
- Hayden, M.R., Tyagi, S.C., Kerklo, M.M. & Nicolls, M.R. (2005) Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease. *Jop*, **6**, 287-302.
- Heffernan, J.M., Eastwood, S.L., Nagy, Z., Sanders, M.W., McDonald, B. & Harrison, P.J. (1998) Temporal cortex synaptophysin mRNA is reduced in Alzheimer's disease and is negatively correlated with the severity of dementia. *Experimental neurology*, **150**, 235-239.
- Heiss, W.D., Szekely, B., Kessler, J. & Herholz, K. (1991) Abnormalities of Energy Metabolism in Alzheimer's Disease Studied with PETa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **640**, 65-71.
- Helmer, C., Joly, P., Letenneur, L., Commenges, D. & Dartigues, J.F. (2001) Mortality with dementia: results from a French prospective community-based cohort. *Am J Epidemiol*, **154**, 642-648.
- Hemmings, B.A., Yellowlees, D., Kernohan, J.C. & Cohen, P. (1981) Purification of Glycogen Synthase Kinase 3 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry*, **119**, 443-451.
- Henderson, A. (1988) The risk factors for Alzheimer's disease: a review and a hypothesis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **78**, 257-275.
- Hendriks, L., van Duijn, C., Cras, P., Cruts, M., Van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M.G., Antonarakis, S.E. & Martin, J.-J. (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature genetics*, **1**, 218-221.

- Henriksen, E.J., Kinnick, T.R., Teachey, M.K., O'Keefe, M.P., Ring, D., Johnson, K.W. & Harrison, S.D. (2003) Modulation of muscle insulin resistance by selective inhibition of GSK-3 in Zucker diabetic fatty rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **284**, E892-E900.
- Hernández, F., Langa, E., Cuadros, R., Avila, J. & Villanueva, N. (2010) Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Molecular and cellular biochemistry*, **344**, 211-215.
- Hernández-Sánchez, C., Mansilla, A., de Pablo, F. & Zardoya, R. (2008) Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. *Molecular biology and evolution*, **25**, 1043-1053.
- Hertze, J. (2016) Pathophysiological Mechanisms and Diagnostic Markers in Alzheimer's Disease. Lund University.
- Hilioti, Z., Gallagher, D.A., Low-Nam, S.T., Ramaswamy, P., Gajer, P., Kingsbury, T.J., Birchwood, C.J., Levchenko, A. & Cunningham, K.W. (2004) GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes & development*, **18**, 35-47.
- Hill, J., Lesniak, M., Pert, C. & Roth, J. (1986) Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience*, **17**, 1127-1138.
- Himsworth, H.P. (2013) Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. 1936. *International journal of epidemiology*, **42**, 1594-1598.
- Ho, L., Qin, W., Pompl, P.N., Xiang, Z., Wang, J., Zhao, Z., Peng, Y., Cambareri, G., Rocher, A. & Mobbs, C.V. (2004) Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB journal*, **18**, 902-904.
- Hodges, J.R. & Patterson, K. (1995) Is semantic memory consistently impaired early in the course of Alzheimer's disease? Neuroanatomical and diagnostic implications. *Neuropsychologia*, **33**, 441-459.
- Hoe, H.-S., Fu, Z., Makarova, A., Lee, J.-Y., Lu, C., Feng, L., Pajooohesh-Ganji, A., Matsuoka, Y., Hyman, B.T. & Ehlers, M.D. (2009) The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 8495-8506.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.-S., Jin, O. & Woodgett, J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature*, **406**, 86-90.
- Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R. & Morgan, D. (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in

transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature medicine*, **4**, 97-100.

- Holcomb, L.A., Gordon, M.N., Jantzen, P., Hsiao, K., Duff, K. & Morgan, D. (1999) Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behavior genetics*, **29**, 177-185.
- Holsinger, R., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L. & Evin, G. (2002) Increased expression of the amyloid precursor β -secretase in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, **51**, 783-786.
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A. & Barres, B.A. (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, **352**, 712-716.
- Hopkins, D. & Williams, G. (1997) Insulin receptors are widely distributed in human brain and bind human and porcine insulin with equal affinity. *Diabetic medicine*, **14**, 1044-1050.
- Hori, Y., Hashimoto, T., Wakutani, Y., Urakami, K., Nakashima, K., Condrón, M.M., Tsubuki, S., Saido, T.C., Teplow, D.B. & Iwatsubo, T. (2007) The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer disease mutations accelerate A β fibril formation without increasing protofibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 4916-4923.
- Horton, E.S. (2010) Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus *Principles of diabetes mellitus*. Springer, pp. 820-832.
- Houstis, N., Rosen, E.D. & Lander, E.S. (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, **440**, 944-948.
- Hoyer, S. (1998) Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *Journal of neural transmission*, **105**, 415-422.
- Hoyer, S. (2002) The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review. *Journal of neural transmission*, **109**, 991-1002.
- Hoyer, S. (2004) Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol*, **490**, 115-125.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. & Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, **274**, 99-103.

- Huang, J. & Klionsky, D.J. (2007) Autophagy and human disease. *Cell cycle*, **6**, 1837-1849.
- Huang, Y. & Mucke, L. (2012) Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, **148**, 1204-1222.
- Hubin, E., Deroo, S., Schierle, G.K., Kaminski, C., Serpell, L., Subramaniam, V., van Nuland, N., Broersen, K., Raussens, V. & Sarroukh, R. (2015) Two distinct β -sheet structures in Italian-mutant amyloid-beta fibrils: a potential link to different clinical phenotypes. *Cellular and molecular life sciences*, **72**, 4899-4913.
- Hurtado, D.E., Molina-Porcel, L., Carroll, J.C., MacDonald, C., Aboagye, A.K., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.-Y. (2012) Selectively silencing GSK-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, **32**, 7392-7402.
- Hussain, G., Schmitt, F., Loeffler, J.-P. & Gonzalez De Aguilar, J.L. (2013) Fattening the brain: a brief of recent research. *Frontiers in cellular neuroscience*, **7**, 144.
- Hyde, L.A., Kazdoba, T.M., Grilli, M., Lozza, G., Brussa, R., Zhang, Q., Wong, G.T., McCool, M.F., Zhang, L. & Parker, E.M. (2005) Age-progressing cognitive impairments and neuropathology in transgenic CRND8 mice. *Behavioural brain research*, **160**, 344-355.
- Ikonomic, M.D., Klunk, W.E., Abrahamson, E.E., Mathis, C.A., Price, J.C., Tsopelas, N.D., Lopresti, B.J., Ziolk, S., Bi, W., Paljug, W.R., Debnath, M.L., Hope, C.E., Isanski, B.A., Hamilton, R.L. & DeKosky, S.T. (2008) Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain*, **131**, 1630-1645.
- Imrie, H., Viswambharan, H., Sukumar, P., Abbas, A., Cubbon, R.M., Yuldasheva, N., Gage, M., Smith, J., Galloway, S. & Skromna, A. (2012) Novel Role of the IGF-1 Receptor in Endothelial Function and Repair. *Diabetes*, **61**, 2359-2368.
- Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T. & Shirasawa, T. (2005) Structure of β -amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of bioscience and bioengineering*, **99**, 437-447.
- Ishiguro, K., Ihara, Y., Uchida, T. & Imahori, K. (1988) A novel tubulin-dependent protein kinase forming a paired helical filament epitope on tau. *J Biochem*, **104**, 319-321.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. & Imahori, K. (1993) Glycogen synthase kinase 3 β is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS letters*, **325**, 167-172.

- Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L. & Boscolo, F.S. (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, **482**, 216-220.
- Ittner, L.M. & Götz, J. (2011) Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, **12**, 65-72.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfling, H., Chieng, B.C., Christie, M.J. & Napier, I.A. (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, **142**, 387-397.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D. & Götz, J. (2009) Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 20909-20916.
- Jack, C.R., Wiste, H.J., Vemuri, P., Weigand, S.D., Senjem, M.L., Zeng, G., Bernstein, M.A., Gunter, J.L., Pankratz, V.S. & Aisen, P.S. (2010) Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain*, **133**, 3336-3348.
- Jack Jr, C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Weiner, M.W., Aisen, P.S., Shaw, L.M., Vemuri, P., Wiste, H.J. & Weigand, S.D. (2013) Update on hypothetical model of Alzheimer's disease biomarkers. *Lancet neurology*, **12**, 207.
- Jackson, K., Barisone, G.A., Diaz, E., Jin, L.w., DeCarli, C. & Despa, F. (2013) Amylin deposition in the brain: a second amyloid in Alzheimer disease? *Annals of neurology*, **74**, 517-526.
- Jacobsen, K. (2010) Processing of the APP family by the α -secretases ADAM10 and TACE.
- Jacobsen, K.T. & Iverfeldt, K. (2009) Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cellular and molecular life sciences*, **66**, 2299-2318.
- James, W. (2008) The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of internal medicine*, **263**, 336-352.
- Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H. & Wagner, S.L. (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Human molecular genetics*, **13**, 159-170.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. & Borchelt, D.R. (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomolecular engineering*, **17**, 157-165.

- Janson, J., Laedtke, T., Parisi, J.E., O'Brien, P., Petersen, R.C. & Butler, P.C. (2004) Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes*, **53**, 474-481.
- Janssen, J., Beck, J., Campbell, T., Dickinson, A., Fox, N., Harvey, R., Houlden, H., Rossor, M. & Collinge, J. (2003) Early onset familial Alzheimer's disease Mutation frequency in 31 families. *Neurology*, **60**, 235-239.
- Janssen, J., Hall, M., Fox, N., Harvey, R., Beck, J., Dickinson, A., Campbell, T., Collinge, J., Lantos, P. & Cipelotti, L. (2000) Alzheimer's disease due to an intronic presenilin-1 (PSEN1 intron 4) mutation. *Brain*, **123**, 894-907.
- Janus, C. & Westaway, D. (2001) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav*, **73**, 873-886.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Cavener, D.R. & Wek, R.C. (2003) Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Molecular and cellular biology*, **23**, 5651-5663.
- Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D. & Selkoe, D.J. (2011) Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 5819-5824.
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D. & Maloney, J. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, **488**, 96-99.
- Jope, R.S. & Johnson, G.V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in biochemical sciences*, **29**, 95-102.
- Julien, C., Tremblay, C., Phivilay, A., Berthiaume, L., Émond, V., Julien, P. & Calon, F. (2010) High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiology of aging*, **31**, 1516-1531.
- Jung, K.-M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., Kim, P.K., Kim, D.S., Ryu, S.H. & Chao, M.V. (2003) Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 42161-42169.
- Kaden, D., Harmeier, A., Weise, C., Munter, L.M., Althoff, V., Rost, B.R., Hildebrand, P.W., Schmitz, D., Schaefer, M. & Lurz, R. (2012) Novel APP/A β mutation K16N produces highly toxic heteromeric A β oligomers. *EMBO molecular medicine*, **4**, 647-659.
- Kaether, C., Haass, C. & Steiner, H. (2006) Assembly, trafficking and function of γ -secretase. *Neurodegenerative diseases*, **3**, 275-283.

- Kahn, C.R. & Suzuki, R. (2010) Insulin Action in the Brain and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease *Diabetes, Insulin and Alzheimer's Disease*. Springer, pp. 1-20.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S. & Malinow, R. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron*, **37**, 925-937.
- Kamino, K., Orr, H.T., Payami, H., Wijsman, E.M., Alonso, M.E., Pulst, S.M., Anderson, L., O'dahl, S., Nemens, E. & White, J.A. (1992) Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *American journal of human genetics*, **51**, 998.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (2000) *Principles of Neural Science*. McGraw-hill New York.
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.
- Kao, S.-C., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S. & Tsai, L.-H. (2004) BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 1942-1949.
- Karl, T., Bhatia, S., Cheng, D., Kim, W.S. & Garner, B. (2012) Cognitive phenotyping of amyloid precursor protein transgenic J20 mice. *Behavioural brain research*, **228**, 392-397.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X. & Peck, A. (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Annals of neurology*, **23**, 138-144.
- Kelly, P., Bondolfi, L., Hunziker, D., Schlecht, H.-P., Carver, K., Maguire, E., Abramowski, D., Wiederhold, K.-H., Sturchler-Pierrat, C. & Jucker, M. (2003) Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiology of aging*, **24**, 365-378.
- Kepp, K.P. (2012) Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. *Chemical reviews*, **112**, 5193-5239.
- Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., Born, J. & Fehm, H.L. (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology*, **74**, 270-280.
- Khachaturian, Z.S. (1987) Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiology of aging*, **8**, 345-346.

- Khanahmadi, M., Farhud, D.D. & Malmir, M. (2015) Genetic of Alzheimer's Disease: A Narrative Review Article. *Iran J Public Health*, **44**, 892-901.
- Kim, B. & Feldman, E.L. (2012) Insulin resistance in the nervous system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **23**, 133-141.
- Kim, S., Jensen, J.R., Cisek, K., Funk, K.E., Naphade, S., Schafer, K. & Kuret, J. (2010) Imaging as a strategy for premortem diagnosis and staging of tauopathies. *Curr Alzheimer Res*, **7**, 230-234.
- King, D.L., Arendash, G.W., Crawford, F., Sterk, T., Menendez, J. & Mullan, M.J. (1999) Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP SW transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*, **103**, 145-162.
- Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Lückcrath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W., Martoglio, B. & Hueber, A. (2007) The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death & Differentiation*, **14**, 1678-1687.
- Kirschenbaum, F., Hsu, S.-C., Cordell, B. & McCarthy, J.V. (2001a) Substitution of a glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation site in presenilin 1 separates presenilin function from β -catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7366-7375.
- Kirschenbaum, F., Hsu, S.-C., Cordell, B. & McCarthy, J.V. (2001b) Glycogen synthase kinase-3 β regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 30701-30707.
- Knowles, T.P., Vendruscolo, M. & Dobson, C.M. (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews Molecular cell biology*, **15**, 384-396.
- Koch, G., Di Lorenzo, F., Bonni, S., Ponzo, V., Caltagirone, C. & Martorana, A. (2012) Impaired LTP-but not LTD-like cortical plasticity in Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, **31**, 593-599.
- Kopan, R. & Ilagan, M.X. (2004) Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 499-504.
- Kopf, D. & Frölich, L. (2009) Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *Journal of Alzheimer's Disease*, **16**, 677-685.
- Kuhn, P.-H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C. & Lichtenthaler, S.F. (2007) Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by α -, β -, and γ -secretase. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 11982-11995.

- Kumar, A., Singh, A. & Ekavali (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep*, **67**, 195-203.
- Kumar-Singh, S., De Jonghe, C., Cruts, M., Kleinert, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Löfgren, A. & Vanderhoeven, I. (2000) Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a γ 42-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A β 42 in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, **9**, 2589-2598.
- Kummer, M.P. & Heneka, M.T. (2014) Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimer's Research & Therapy*, **6**, 1-9.
- Kuo, W., Montag, A.G. & Rosner, M.R. (1993) Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues. *Endocrinology*, **132**, 604-611.
- Kurt, M., Davies, D., Kidd, M., Duff, K. & Howlett, D. (2003) Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiology of disease*, **14**, 89-97.
- Kwok, J.B., Li, Q.X., Hallupp, M., Whyte, S., Ames, D., Beyreuther, K., Masters, C.L. & Schofield, P.R. (2000) Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid β 42 (43) peptide levels and induces apoptosis. *Annals of neurology*, **47**, 249-253.
- LaFerla, F.M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 862-872.
- Lai, M.M., Hong, J.J., Ruggiero, A.M., Burnett, P.E., Slepnev, V.I., De Camilli, P. & Snyder, S.H. (1999) The calcineurin-dynamin 1 complex as a calcium sensor for synaptic vesicle endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 25963-25966.
- Lakhtakia, R. (2013) The history of diabetes mellitus. *Sultan Qaboos University medical journal*, **13**, 368.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufienbiel, M., Sturchler-Pierrat, C. & Strazielle, C. (2002) Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain research*, **956**, 36-44.
- Lalonde, R., Kim, H. & Fukuchi, K. (2004) Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP^{swe}+ PS1/ Δ E9 mice. *Neuroscience letters*, **369**, 156-161.

- Lalonde, R., Kim, H., Maxwell, J. & Fukuchi, K. (2005) Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP 695 SWE/co+PS1/ Δ E9 mice with amyloid plaques. *Neuroscience letters*, **390**, 87-92.
- Lalowski, M., Golabek, A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Wisniewski, H.M., Beavis, R.C., Frangione, B. & Wisniewski, T. (1996) The “nonamyloidogenic” p3 fragment (Amyloid β 17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 33623-33631.
- Lambracht-Washington, D. & Rosenberg, R.N. (2013) Advances in the Development of Vaccines for Alzheimer's Disease. *Discovery medicine*, **15**, 319-326.
- Lanz, T., Carter, D. & Merchant, K. (2003) Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiology of disease*, **13**, 246-253.
- Last, D., Alsop, D.C., Abduljalil, A.M., Marquis, R.P., De Bazelaire, C., Hu, K., Cavallerano, J. & Novak, V. (2007) Global and regional effects of type 2 diabetes on brain tissue volumes and cerebral vasoreactivity. *Diabetes care*, **30**, 1193-1199.
- Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M.C. & Andriantsitohaina, R. (2014) Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2014**.
- Le Roith, D. & Zick, Y. (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes care*, **24**, 588-597.
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C. & Hammond, J. (1999) Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 23426-23436.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H. & Panchamoorthy, G. (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *Journal of cell science*, **111**, 3167-3177.
- Lee, H.R., Shin, H.K., Park, S.Y., Kim, H.Y., Lee, W.S., Rhim, B.Y., Hong, K.W. & Kim, C.D. (2014) Cilostazol suppresses β -amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor- β . *Journal of neuroscience research*, **92**, 1581-1590.
- Lee, M.-S., Kao, S.-C., Lemere, C.A., Xia, W., Tseng, H.-C., Zhou, Y., Neve, R., Ahljianian, M.K. & Tsai, L.-H. (2003) APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *The Journal of cell biology*, **163**, 83-95.

- Lee, M.K., Slunt, H.H., Martin, L.J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S.E., Seeger, M., Koo, E., Price, D.L. & Sisodia, S.S. (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *the Journal of Neuroscience*, **16**, 7513-7525.
- Lee, V.M., Goedert, M. & Trojanowski, J.Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annual review of neuroscience*, **24**, 1121-1159.
- Leissring, M.A., Akbari, Y., Fanger, C.M., Cahalan, M.D., Mattson, M.P. & LaFerla, F.M. (2000) Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *The Journal of cell biology*, **149**, 793-798.
- Lemere, C., Blusztajn, J., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. & Selkoe, D. (1996a) Sequence of deposition of heterogeneous amyloid β -peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiology of disease*, **3**, 16-32.
- Lemere, C.A., Lopera, F., Kosik, K.S., Lendon, C.L., Ossa, J., Saido, T.C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A. & Madrigal, L. (1996b) The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature medicine*, **2**, 1146-1150.
- Lemere, C.A. & Masliah, E. (2010) Can Alzheimer disease be prevented by amyloid- β immunotherapy? *Nature Reviews Neurology*, **6**, 108-119.
- Leroy, K. & Brion, J.-P. (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 β in rat brain. *Journal of chemical neuroanatomy*, **16**, 279-293.
- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M. & Ashe, K.H. (2006) A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, **440**, 352-357.
- Lesort, M., Jope, R.S. & Johnson, G.V. (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation. *Journal of neurochemistry*, **72**, 576-584.
- Leu, J.P. & Zonszein, J. (2010) Diagnostic Criteria and Classification of Diabetes *Principles of diabetes mellitus*. Springer, pp. 107-115.
- Levin-Allerhand, J., Lominska, C. & Smith, J. (2001) Increased amyloid-levels in APPSWE transgenic mice treated chronically with a physiological high-fat high-cholesterol diet. *The journal of nutrition, health & aging*, **6**, 315-319.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.-e., Jondro, P.D., Schmidt, S.D. & Wang, K. (1995a) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, **269**, 973-977.

- Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K., Weber, J.L., Bird, T.D. & Schellenberg, G.D. (1995b) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*, **269**, 970-973.
- Lewczuk, P., Mroczko, B., Fagan, A. & Kornhuber, J. (2015) Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a current perspective. *Adv Med Sci*, **60**, 76-82.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.-L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.-H., Sahara, N., Skipper, L. & Yager, D. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, **293**, 1487-1491.
- Li, Q. & Südhof, T.C. (2004a) Cleavage of amyloid- β precursor protein and amyloid- β precursor-like protein by BACE 1. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 10542-10550.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L.-B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M. & Cai, H. (2004b) Amyloid β peptide load is correlated with increased β -secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 3632-3637.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M. & Selkoe, D. (2009) Soluble oligomers of amyloid β protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, **62**, 788-801.
- Li, T. & Paudel, H.K. (2006) Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*, **45**, 3125-3133.
- Li, Y., Zhou, W., Tong, Y., He, G. & Song, W. (2006) Control of APP processing and A β generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription. *The FASEB Journal*, **20**, 285-292.
- Li, Z.-g., Zhang, W. & Sima, A.A. (2007) Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes*, **56**, 1817-1824.
- Liberman, Z. & Eldar-Finkelman, H. (2005) Serine 332 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 by glycogen synthase kinase-3 attenuates insulin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 4422-4428.
- Lichtenthaler, S.F., Haass, C. & Steiner, H. (2011) Regulated intramembrane proteolysis—lessons from amyloid precursor protein processing. *Journal of neurochemistry*, **117**, 779-796.
- Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. & Gong, C.-X. (2008) Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS letters*, **582**, 359-364.

- Liu, Y., Walter, S., Stagi, M., Cherny, D., Letiembre, M., Schulz-Schaeffer, W., Heine, H., Penke, B., Neumann, H. & Fassbender, K. (2005) LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, **128**, 1778-1789.
- Lo Monte, F., Kramer, T., Gu, J., Anumala, U.R., Marinelli, L., La Pietra, V., Novellino, E., Franco, B.n.d., Demedts, D. & Van Leuven, F. (2012) Identification of glycogen synthase kinase-3 inhibitors with a selective sting for glycogen synthase kinase-3 α . *Journal of medicinal chemistry*, **55**, 4407-4424.
- Lopez, O.L., Becker, J.T., Wahed, A.S., Saxton, J., Sweet, R.A., Wolk, D.A., Klunk, W. & Dekosky, S.T. (2009) Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **80**, 600-607.
- Lott, I.T. (2012) Neurological phenotypes for Down syndrome across the life span. *Progress in brain research*, **197**, 101.
- Lovasic, L., Bauschke, H. & Janus, C. (2005) Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior*, **4**, 197-208.
- Lovestone, S., Reynolds, C.H., Latimer, D., Davis, D.R., Anderton, B.H., Gallo, J.-M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B. & Stabel, S. (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Current Biology*, **4**, 1077-1086.
- Lu, D.C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R.F., Ellerby, L.M., Ye, X., Salvesen, G.S., Koo, E.H. & Bredesen, D.E. (2000) A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid β -protein precursor. *Nature medicine*, **6**, 397-404.
- Lu, D.C., Soriano, S., Bredesen, D.E. & Koo, E.H. (2003) Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid β -protein toxicity. *Journal of neurochemistry*, **87**, 733-741.
- Luca, S., Yau, W.-M., Leapman, R. & Tycko, R. (2007) Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR. *Biochemistry*, **46**, 13505-13522.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.-X., Shea, S. & Mayeux, R. (2004) Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*, **63**, 1187-1192.
- Lue, L.-F., Kuo, Y.-M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E. & Rogers, J. (1999) Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, **155**, 853-862.

- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S. & Chaney, M. (2004) ABAD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's Disease. *Science*, **304**, 448-452.
- Ly, P.T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., Zhang, M., Yang, Y., Cai, F., Woodgett, J. & Song, W. (2013) Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J Clin Invest*, **123**, 224-235.
- Ma, S.L., Pastorino, L., Zhou, X.Z. & Lu, K.P. (2012a) Prolyl Isomerase Pin1 Promotes Amyloid Precursor Protein (APP) Turnover by Inhibiting Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β) Activity NOVEL MECHANISM FOR Pin1 TO PROTECT AGAINST ALZHEIMER DISEASE. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 6969-6973.
- Ma, T. & Klann, E. (2012b) Amyloid β : linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, **120**, 140-148.
- Maccioni, R.B., Farías, G., Morales, I. & Navarrete, L. (2010) The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Archives of medical research*, **41**, 226-231.
- Magara, F., Müller, U., Li, Z.-W., Lipp, H.-P., Weissmann, C., Stagljar, M. & Wolfer, D.P. (1999) Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the β -amyloid-precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 4656-4661.
- Magistretti, P.J. (2006) Neuron–glia metabolic coupling and plasticity. *Journal of Experimental Biology*, **209**, 2304-2311.
- Magistretti, P.J. & Allaman, I. (2013) Brain energy metabolism *Neuroscience in the 21st Century*. Springer, pp. 1591-1620.
- Magistretti, P.J., Pellerin, L., Rothman, D.L. & Shulman, R.G. (1999) Energy on demand. *Science*, **283**, 496.
- Mahon, M.J. (2011) pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green fluorescent protein. *Advances in bioscience and biotechnology (Print)*, **2**, 132-137.
- Malenka, R.C. & Bear, M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, **44**, 5-21.
- Mamelak, M. (2012) Sporadic Alzheimer's disease: the starving brain. *Journal of Alzheimer's Disease*, **31**, 459-474.
- Maqbool, M., Mobashir, M. & Hoda, N. (2016) Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, **107**, 63-81.

- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarnier, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S. & Shao, Z. (2002) A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *The EMBO journal*, **21**, 1948-1956.
- Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R. & Robakis, N.K. (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/ ϵ -cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell*, **114**, 635-645.
- Markesbery, W.R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **23**, 134-147.
- Marks, D.R., Tucker, K., Cavallin, M.A., Mast, T.G. & Fadool, D.A. (2009) Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 6734-6751.
- Marks, J.L., Porte Jr, D., Stahl, W.L. & Baskin, D.G. (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*, **127**, 3234-3236.
- Maruyama, K., Tomita, T., Shinozaki, K., Kume, H., Asada, H., Saido, T.C., Ishiura, S., Iwatsubo, T. & Obata, K. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked mutations at Val717 of amyloid precursor protein are specific for the increased secretion of A β 42(43). *Biochem Biophys Res Commun*, **227**, 730-735.
- Marzban, L., Park, K. & Verchere, C.B. (2003) Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Experimental gerontology*, **38**, 347-351.
- Maslah, E., Sisk, A., Mallory, M. & Games, D. (2001) Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **60**, 357-368.
- Matioli, M.N.P. & Nitrini, R. (2015) Mechanisms linking brain insulin resistance to Alzheimer's disease. *Dementia & Neuropsychologia*, **9**, 96-102.
- McClean, P.L., Parthasarathy, V., Faivre, E. & Holscher, C. (2011) The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **31**, 6587-6594.
- McGowan, M.K., Andrews, K.M. & Grossman, S.P. (1992) Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiology & behavior*, **51**, 753-766.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. & Stadlan, E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease Report of the NINCDS-ADRDA Work

Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, **34**, 939-939.

- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Vbeyreuther, K., Bush, A.I. & Masters, C.L. (1999) Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, **46**, 860-866.
- Medina, M. & Avila, J. (2013) Understanding the relationship between GSK-3 and Alzheimer's disease: a focus on how GSK-3 can modulate synaptic plasticity processes. *Expert review of neurotherapeutics*, **13**, 495-503.
- Miguel-Hidalgo, J.J., Paul, I.A., Wanzo, V. & Banerjee, P.K. (2012) Memantine prevents cognitive impairment and reduces Bcl-2 and caspase 8 immunoreactivity in rats injected with amyloid β 1–40. *European journal of pharmacology*, **692**, 38-45.
- Miklossy, J., Qing, H., Radenovic, A., Kis, A., Vilenó, B., László, F., Miller, L., Martins, R.N., Waeber, G. & Mooser, V. (2010) Beta amyloid and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes. *Neurobiology of aging*, **31**, 1503-1515.
- Miles, W. & Root, H. (1922) Psychologic tests applied to diabetic patients. *Archives of Internal Medicine*, **30**, 767-777.
- Mill, J.F., Chao, M.V. & Ishii, D.N. (1985) Insulin, insulin-like growth factor II, and nerve growth factor effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**, 7126-7130.
- Milner, B., Squire, L.R. & Kandel, E.R. (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, **20**, 445-468.
- Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K.A., Foster, N.L. & Kuhl, D.E. (1997) Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, **42**, 85-94.
- Mirae-Nedjad, S. (2013) Early Events in the Onset of Type II Diabetes: Effects of Aggregated Amylin (IAPP) on the IsletProteome and Metabolic Pathways.
- Mirsky, I.A. & Broh-Kahn, R.H. (1948) The role of insulinase in the regulation of carbohydrate metabolism. *J Clin Invest*, **27**, 549.
- Mitchell, A.J. & Shiri-Feshki, M. (2009) Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia—meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, **119**, 252-265.
- Moloney, A.M., Griffin, R.J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R. & O'Neill, C. (2010) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate

- possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of aging*, **31**, 224-243.
- Mooradian, A.D. (2009) Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, **5**, 150-159.
- Moore, S., Evans, L.D., Andersson, T., Portelius, E., Smith, J., Dias, T.B., Saurat, N., McGlade, A., Kirwan, P. & Blennow, K. (2015) APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons. *Cell reports*, **11**, 689-696.
- Morales-Corraliza, J., Wong, H., Mazzella, M.J., Che, S., Lee, S.H., Petkova, E., Wagner, J.D., Hemby, S.E., Ginsberg, S.D. & Mathews, P.M. (2016) Brain-Wide Insulin Resistance, Tau Phosphorylation Changes, and Hippocampal Neprilysin and Amyloid- β Alterations in a Monkey Model of Type 1 Diabetes. *Journal of Neuroscience*, **36**, 4248-4258.
- Moreira, P.I. (2012) Alzheimer's disease and diabetes: an integrative view of the role of mitochondria, oxidative stress, and insulin. *Journal of Alzheimer's Disease*, **30**.
- Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H.C., Pigino, G., DeBoer, S., Beffert, U. & Brady, S.T. (2004) A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *The EMBO journal*, **23**, 2235-2245.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G. & Wilcock, D. (2000) A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, **408**, 982-985.
- Morris, J.C., Roe, C.M., Grant, E.A., Head, D., Storandt, M., Goate, A.M., Fagan, A.M., Holtzman, D.M. & Mintun, M.A. (2009) Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease. *Archives of neurology*, **66**, 1469-1475.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. & Mucke, L. (2011) The many faces of tau. *Neuron*, **70**, 410-426.
- Mortimore, G.E. & Schworer, C.M. (1977) Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver.
- Morton, G., Cummings, D., Baskin, D., Barsh, G. & Schwartz, M. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, **443**, 289-295.
- Mosconi, L., Perani, D., Sorbi, S., Herholz, K., Nacmias, B., Holthoff, V., Salmon, E., Baron, J.-C., De Cristofaro, M. & Padovani, A. (2004) MCI conversion to dementia and the APOE genotype A prediction study with FDG-PET. *Neurology*, **63**, 2332-2340.

- Mosthaf, L., Grako, K., Dull, T.J., Coussens, L., Ullrich, A. & McClain, D.A. (1990) Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *Embo j*, **9**, 2409-2413.
- Mosthaf, L., Vogt, B., Häring, H. & Ullrich, A. (1991) Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**, 4728-4730.
- Motamedi-Shad, N., Monsellier, E. & Chiti, F. (2009) Amyloid formation by the model protein muscle acylphosphatase is accelerated by heparin and heparan sulphate through a scaffolding-based mechanism. *Journal of biochemistry*, **146**, 805-814.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K. & McConlogue, L. (2000) High-level neuronal expression of A β 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of neuroscience*, **20**, 4050-4058.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B. & Lannfelt, L. (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nature genetics*, **1**, 345-347.
- Mumm, J.S. & Kopan, R. (2000) Notch signaling: from the outside in. *Developmental biology*, **228**, 151-165.
- Murakami, K., Yokoyama, S.-i., Murata, N., Ozawa, Y., Irie, K., Shirasawa, T. & Shimizu, T. (2011) Insulin receptor mutation results in insulin resistance and hyperinsulinemia but does not exacerbate Alzheimer's-like phenotypes in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, **409**, 34-39.
- Muratore, C.R., Rice, H.C., Srikanth, P., Callahan, D.G., Shin, T., Benjamin, L.N., Walsh, D.M., Selkoe, D.J. & Young-Pearse, T.L. (2014) The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Human molecular genetics*, ddu064.
- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B. & Benson, M.D. (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, **254**, 97-99.
- Murrell, J.R., Hake, A.M., Quaid, K.A., Farlow, M.R. & Ghetti, B. (2000) Early-onset Alzheimer disease caused by a new mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene. *Archives of neurology*, **57**, 885-887.
- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P. & Buxbaum, J.D. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *Jama*, **283**, 1571-1577.

- Nelson, R.L., Guo, Z., Halagappa, V.M., Pearson, M., Gray, A.J., Matsuoka, Y., Brown, M., Martin, B., Iyun, T. & Maudsley, S. (2007) Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioral deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3xTgAD mice. *Experimental neurology*, **205**, 166-176.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M. & Donlon, T.A. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*, **387**, 271-280.
- Newington, J.T. (2013) Amyloid beta resistance and the Warburg effect: Re-examining Alzheimer's disease. The University of Western Ontario.
- Nicholson-Fish, J.C., Smillie, K.J. & Cousin, M.A. (2016) Monitoring activity-dependent bulk endocytosis with the genetically-encoded reporter VAMP4-pHluorin. *Journal of neuroscience methods*, **266**, 1-10.
- Nikoulina, S.E., Ciaraldi, T.P., Mudaliar, S., Carter, L., Johnson, K. & Henry, R.R. (2002) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 improves insulin action and glucose metabolism in human skeletal muscle. *Diabetes*, **51**, 2190-2198.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condrón, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Stenlund, C., Luthman, J., Teplow, D.B. & Younkin, S.G. (2001) The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature neuroscience*, **4**, 887-893.
- Nilsson, E. (2006a) *Diabetes and cognitive functioning: The role of age and comorbidity*. Inst för neurobiologi, vårdvetenskap och samhälle/Dept of Neurobiology, Care Sciences and Society.
- Nilsson, L.N., Arendash, G.W., Leighty, R.E., Costa, D.A., Low, M.A., Garcia, M.F., Cracciolo, J.R., Rojiani, A., Wu, X. & Bales, K.R. (2004) Cognitive impairment in PDAPP mice depends on ApoE and ACT-catalyzed amyloid formation. *Neurobiology of aging*, **25**, 1153-1167.
- Nilsson, T. (2006b) *Amyloid precursor protein: cellular studies and animal models*. Institutionen för neurobiologi, vårdvetenskap och samhälle/Department of Neurobiology, Care Sciences and Society.
- Nordstedt, C., Caporaso, G., Thyberg, J., Gandy, S. & Greengard, P. (1993) Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 608-612.
- Nunan, J., Williamson, N.A., Hill, A.F., Sernee, M.F., Masters, C.L. & Small, D.H. (2003) Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease β -

amyloid protein precursor: Effect of C-terminal truncation on production of β -amyloid protein. *Journal of neuroscience research*, **74**, 378-385.

- O'Connor, T., Sadleir, K.R., Maus, E., Velliquette, R.A., Zhao, J., Cole, S.L., Eimer, W.A., Hitt, B., Bembinster, L.A. & Lammich, S. (2008) Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron*, **60**, 988-1009.
- O'Leary, T.P. & Brown, R.E. (2009) Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*, **201**, 120-127.
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J. & Van Eldik, L. (2006) Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience*, **26**, 10129-10140.
- Obici, L., Demarchi, A., de Rosa, G., Bellotti, V., Marciano, S., Donadei, S., Arbustini, E., Palladini, G., Diegoli, M. & Genovese, E. (2005) A novel A β PP mutation exclusively associated with cerebral amyloid angiopathy. *Annals of neurology*, **58**, 639-644.
- Obici, S., Zhang, B.B., Karkanias, G. & Rossetti, L. (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature medicine*, **8**, 1376-1382.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H. & LaFerla, F.M. (2004) A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*, **43**, 321-332.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. & LaFerla, F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, **39**, 409-421.
- Ohno, M., Chang, L., Tseng, W., Oakley, H., Citron, M., Klein, W.L., Vassar, R. & Disterhoft, J.F. (2006) Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *European Journal of Neuroscience*, **23**, 251-260.
- Ohno, M., Sametsky, E.A., Younkin, L.H., Oakley, H., Younkin, S.G., Citron, M., Vassar, R. & Disterhoft, J.F. (2004) BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, **41**, 27-33.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Murakami, D., Sasayama, T., Araki, N., Miki, T., Wong, A.J. & Saya, H. (2001) Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *The Journal of cell biology*, **155**, 755-762.

- Olshansky, S.J., Passaro, D.J., Hershow, R.C., Layden, J., Carnes, B.A., Brody, J., Hayflick, L., Butler, R.N., Allison, D.B. & Ludwig, D.S. (2005) A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *New England Journal of Medicine*, **352**, 1138-1145.
- Ooi, L., Sidhu, K., Poljak, A., Sutherland, G., O'Connor, M.D., Sachdev, P. & Münch, G. (2013) Induced pluripotent stem cells as tools for disease modelling and drug discovery in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, **120**, 103-111.
- Opie, E.L. (1901) On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the Islands of Langerhans and to diabetes melutus. *The Journal of experimental medicine*, **5**, 397-428.
- Oskarsson, M. (2015) Islet amyloid polypeptide (IAPP) in Type 2 diabetes and Alzheimer disease.
- Osler, W. (1892) *The principles and practice of medicine: designed for the use of practitioners and students of medicine*. D. Appleton.
- Ott, A., Stolk, R., Van Harskamp, F., Pols, H., Hofman, A. & Breteler, M. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia The Rotterdam Study. *Neurology*, **53**, 1937-1937.
- Ott, M.-O. & Bullock, S. (2001) A gene trap insertion reveals that amyloid precursor protein expression is a very early event in murine embryogenesis. *Development genes and evolution*, **211**, 355-357.
- Palop, J.J., Jones, B., Kekonius, L., Chin, J., Yu, G.-Q., Raber, J., Masliah, E. & Mucke, L. (2003) Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 9572-9577.
- Papaconstantinou, J. (2009) Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination. *Molecular and cellular endocrinology*, **299**, 89-100.
- Pappolla, M., Bryant-Thomas, T., Herbert, D., Pacheco, J., Garcia, M.F., Manjon, M., Girones, X., Henry, T., Matsubara, E. & Zambon, D. (2003) Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology*, **61**, 199-205.
- Pardossi-Piquard, R. & Checler, F. (2012) The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *Journal of neurochemistry*, **120**, 109-124.
- Park, C.R., Seeley, R.J., Craft, S. & Woods, S.C. (2000) Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiology & Behavior*, **68**, 509-514.

- Park, J.H., Widi, G.A., Gimbel, D.A., Harel, N.Y., Lee, D.H. & Strittmatter, S.M. (2006) Subcutaneous Nogo receptor removes brain amyloid- β and improves spatial memory in Alzheimer's transgenic mice. *The Journal of neuroscience*, **26**, 13279-13286.
- Parrizas, M., Gazit, A., Levitzki, A., Wertheimer, E. & LeRoith, D. (1997) Specific inhibition of insulin-like growth factor-I and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins. *Endocrinology*, **138**, 1427-1433.
- Pasalar, P., Najmabadi, H., Noorian, A., Moghimi, B., Jannati, A., Soltanzadeh, A., Krefft, T., Crook, R. & Hardy, J. (2002) An Iranian family with Alzheimer's disease caused by a novel APP mutation (Thr714Ala). *Neurology*, **58**, 1574-1575.
- Pastorino, L., Sun, A., Lu, P.-J., Zhou, X.Z., Balastik, M., Finn, G., Wulf, G., Lim, J., Li, S.-H. & Li, X. (2006) The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid- β production. *Nature*, **440**, 528-534.
- Pauling, L. & Corey, R.B. (1951) The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **37**, 251-256.
- Peacock, M., Murman, D.L., Sima, A., Warren, J., Roses, A. & Fink, J. (1994) Novel amyloid precursor protein gene mutation (codon 665Asp) in a patient with late-onset Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, **35**, 432-438.
- Peacock, M.L., Warren, J.T., Roses, A.D. & Fink, J.K. (1993) Novel polymorphism in the A4 region of the amyloid precursor protein gene in a patient without Alzheimer's disease. *Neurology*, **43**, 1254-1254.
- Pedersen, W.A., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Leverenz, J.B., Craft, S. & Haynatzki, G.R. (2006) Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. *Experimental neurology*, **199**, 265-273.
- Peila, R., Rodriguez, B.L. & Launer, L.J. (2002) Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes*, **51**, 1256-1262.
- Peng, X.-L., Hou, L., Xu, S.-H., Hua, Y., Zhou, S.-J., Zhang, Y., Zheng, Y.-P., Fu, Y.-H., Xu, Q. & Zhang, L.-S. (2014) Novel APP K724M mutation causes Chinese early-onset familial Alzheimer's disease and increases amyloid- β 42 to amyloid- β 40 ratio. *Neurobiology of aging*, **35**, 2657. e2651-2657. e2656.
- Perez, R.G., Soriano, S., Hayes, J.D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B. & Koo, E.H. (1999) Mutagenesis identifies new signals for β -amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 18851-18856.

- Perl, D.P. (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, **77**, 32-42.
- Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F. & Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 16742-16747.
- Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M.-Y. & Klein, P.S. (2003) GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature*, **423**, 435-439.
- Pierrot, N., Santos, S.F., Feyt, C., Morel, M., Brion, J.-P. & Octave, J.-N. (2006) Calcium-mediated transient phosphorylation of tau and amyloid precursor protein followed by intraneuronal amyloid- β accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 39907-39914.
- Pietropaolo, S., Feldon, J. & Yee, B.K. (2008) Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Behavioral neuroscience*, **122**, 733.
- Pirkmajer, S. & Chibalin, A.V. (2011) Serum starvation: caveat emptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **301**, C272-C279.
- Planel, E., Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Liu, L., Wang, L., Herman, M., Yu, W.H., Luchsinger, J.A., Wadzinski, B. & Duff, K.E. (2007) Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *The Journal of neuroscience*, **27**, 13635-13648.
- Polvikoski, T., Sulkava, R., Haltia, M., Kainulainen, K., Vuorio, A., Verkkoniemi, A., Niinistö, L., Halonen, P. & Kontula, K. (1995) Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of β -amyloid protein. *New England Journal of Medicine*, **333**, 1242-1248.
- Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M. & Schellenberg, G.D. (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of neurology*, **43**, 815-825.
- Posner, I., Engel, M., Gazit, A. & Levitzki, A. (1994) Kinetics of inhibition by tyrphostins of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and analysis by a new computer program. *Molecular pharmacology*, **45**, 673-683.
- Potau, N., Escofet, M. & Martinez, M. (1991) Ontogenesis of insulin receptors in human cerebral cortex. *Journal of endocrinological investigation*, **14**, 53-58.

- Prasher, V., Farrer, M.J., Kessling, A.M., Fisher, E., West, R., Barber, P. & Butler, A. (1998) Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Annals of neurology*, **43**, 380-383.
- Prut, L., Abramowski, D., Krucker, T., Levy, C., Roberts, A., Staufenbiel, M. & Wiessner, C. (2007) Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behavioural brain research*, **179**, 107-110.
- Qing, H., He, G., Ly, P.T., Fox, C.J., Staufenbiel, M., Cai, F., Zhang, Z., Wei, S., Sun, X. & Chen, C.-H. (2008) Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *The Journal of experimental medicine*, **205**, 2781-2789.
- Qiu, W.Q. & Folstein, M.F. (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- β peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of aging*, **27**, 190-198.
- Querfurth, H.W. & Selkoe, D.J. (1994) Calcium Ionophore Increases Amyloid. beta. Peptide Production by Cultured Cells. *Biochemistry*, **33**, 4550-4561.
- Rains, J.L. & Jain, S.K. (2011) Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, **50**, 567-575.
- Raizada, M.K. (1983) Localization of insulin-like immunoreactivity in the neurons from primary cultures of rat brain. *Experimental cell research*, **143**, 351-357.
- Ramos-Rodriguez, J.J., Spires-Jones, T., Pooler, A.M., Lechuga-Sancho, A.M., Bacsikai, B.J. & Garcia-Alloza, M. (2016) Progressive Neuronal Pathology and Synaptic Loss Induced by Prediabetes and Type 2 Diabetes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*, 1-11.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P. & Ferreira, A. (2002) Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 6364-6369.
- Razay, G. & Wilcock, G.K. (1994) Hyperinsulinaemia and Alzheimer's disease. *Age and ageing*, **23**, 396-399.
- Reaven, G., Hollenbeck, C. & Chen, Y.-D. (1989) Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia*, **32**, 52-55.
- Reaven, G.M. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **37**, 1595-1607.
- Reaven, G.M., Brand, R.J., Chen, Y.-D.I., Mathur, A.K. & Goldfine, I. (1993) Insulin resistance and insulin secretion are determinants of oral glucose tolerance in normal individuals. *Diabetes*, **42**, 1324-1332.

- Rebelo, S., Vieira, S.I., e Silva, O.d.C., Esselmann, H., Wiltfang, J. & e Silva, E.d.C. (2007) Tyr687 dependent APP endocytosis and Abeta production. *Journal of molecular neuroscience*, **32**, 1-8.
- Reese, L.C., Laezza, F., Woltjer, R. & Taglialatela, G. (2011) Dysregulated phosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II- α in the hippocampus of subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, **119**, 791-804.
- Reger, M., Watson, G., Frey, W.n., Baker, L., Cholerton, B., Keeling, M., Belongia, D., Fishel, M., Plymate, S. & Schellenberg, G. (2006) Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiology of aging*, **27**, 451-458.
- Reiserer, R., Harrison, F., Syverud, D. & McDonald, M. (2007) Impaired spatial learning in the APPSwe+ PSEN1 Δ E9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior*, **6**, 54-65.
- Roberson, E.D., Searce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-Q. & Mucke, L. (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, **316**, 750-754.
- Roberts, R. & Knopman, D.S. (2013) Classification and epidemiology of MCI. *Clinics in geriatric medicine*, **29**, 753-772.
- Robinson, R. (2016) Fifteen Years of Publication: Then and Now: Alzheimer's Disease Immunotherapy: New Lessons, New Approaches, New Hope. *Neurology Today*, **16**, 10-11.
- Rockenstein, E., Torrance, M., Adame, A., Mante, M., Bar-on, P., Rose, J.B., Crews, L. & Masliah, E. (2007) Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3 β signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. *The Journal of neuroscience*, **27**, 1981-1991.
- Rönnemaa, E., Zethelius, B., Sundelöf, J., Sundström, J., Degerman-Gunnarsson, M., Berne, C., Lannfelt, L. & Kilander, L. (2008) Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology*, **71**, 1065-1071.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillette, S., Brice, A. & Vercelletto, M. (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature genetics*, **38**, 24-26.

- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E. & Fiol, C. (1996) Binding of GSK3 β to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, **272**, 1023.
- Ryder, J., Su, Y., Liu, F., Li, B., Zhou, Y. & Ni, B. (2003) Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochemical and biophysical research communications*, **312**, 922-929.
- Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H., Ji, Y., Quartermain, D., Jensen, C.H., Duff, K., Nixon, R.A., Gruen, R.J. & Wisniewski, T. (2004) Amyloid- β deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory impairment in APP/PS1 mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **63**, 418-428.
- Salkovic-Petrisic, M. & Hoyer, S. (2007) *Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach*. Springer.
- Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., Veerle, B., Coen, K., Munck, S. & De Strooper, B. (2011) ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, E559-E568.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M. & McGowan, E. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, **309**, 476-481.
- Santomauro, A., Boden, G., Silva, M., Rocha, D.M., Santos, R.F., Ursich, M., Strassmann, P.G. & Wajchenberg, B.L. (1999) Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*, **48**, 1836-1841.
- Sarasa, M., Sorribas, V., Tor, Terrado, J., Climent, S., Palacios, J.M. & Mengod, G. (2000) Alzheimer β -amyloid precursor proteins display specific patterns of expression during embryogenesis. *Mechanisms of development*, **94**, 233-236.
- Sathianathan, V., Avelino, A., Charrua, A., Santha, P., Matesz, K., Cruz, F. & Nagy, I. (2003) Insulin induces cobalt uptake in a subpopulation of rat cultured primary sensory neurons. *European Journal of Neuroscience*, **18**, 2477-2486.
- Schaeffer, E.L., Figueiro, M. & Gattaz, W.F. (2011) Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics*, **66**, 45-54.
- Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L. & Alonso, M.E. (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*, **258**, 668-671.

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K. & Khan, K. (1999) Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, **400**, 173-177.
- Schettini, G., Govoni, S., Racchi, M. & Rodriguez, G. (2010) Phosphorylation of APP-CTF-AICD domains and interaction with adaptor proteins: signal transduction and/or transcriptional role—relevance for Alzheimer pathology. *Journal of neurochemistry*, **115**, 1299-1308.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T., Hardy, J., Hutton, M. & Kukull, W. (1996) Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature medicine*, **2**, 864-870.
- Schubert, D. (2005) Glucose metabolism and Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, **4**, 240-257.
- Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Alber, J., Galldiks, N. & Küstermann, E. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 3100-3105.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J. & Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**, 661-671.
- Sebastião, I., Candeias, E., Santos, M.S., de Oliveira, C.R., Moreira, P.I. & Duarte, A.I. (2014) Insulin as a bridge between type 2 diabetes and Alzheimer disease—How anti-diabetics could be a solution for dementia. *Front. Endocrinol.(Lausanne)*, **5**, 110.
- Selkoe, D.J. (1991) Alzheimer's disease. In the beginning. *Nature*, **354**, 432-433.
- Selkoe, D.J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, **298**, 789-791.
- Selkoe, D.J. (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature*, **426**, 900-904.
- Selkoe, D.J. & Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E. & Hyman, B.T. (2011) Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **1**.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J. & Lemere, C.A. (2008) Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*, **14**, 837-842.

- Sharfi, H. & Eldar-Finkelman, H. (2008) Sequential phosphorylation of insulin receptor substrate-2 by glycogen synthase kinase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase plays a role in hepatic insulin signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **294**, E307-E315.
- Shariati, S.A.M. & De Strooper, B. (2013) Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family. *FEBS letters*, **587**, 2036-2045.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F.L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal*, **16**, 869-871.
- Shemesh, E., Rudich, A., Harman-Boehm, I. & Cukierman-Yaffe, T. (2011) Effect of intranasal insulin on cognitive function: a systematic review. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **97**, 366-376.
- Shen, Y., Rosendale, M., Campbell, R.E. & Perrais, D. (2014) pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo-and endocytosis. *The Journal of cell biology*, **207**, 419-432.
- Sheng, J.G., Mrak, R.E. & Griffin, W.S.T. (1997) Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta neuropathologica*, **94**, 1-5.
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., MacLean, G., Orkin, S.H. & Livesey, F.J. (2012) A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Science translational medicine*, **4**, 124ra129-124ra129.
- Shintani, T. & Klionsky, D.J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, **306**, 990-995.
- Shukla, V., Zheng, Y.-L., Mishra, S.K., Amin, N.D., Steiner, J., Grant, P., Kesavapany, S. & Pant, H.C. (2013) A truncated peptide from p35, a Cdk5 activator, prevents Alzheimer's disease phenotypes in model mice. *The FASEB Journal*, **27**, 174-186.
- Shulman, G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, **106**, 171-176.
- Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L. & Shulman, R.G. (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 316-321.
- Simpson, I.A., Chundu, K.R., Davies-Hill, T., Honer, W.G. & Davies, P. (1994) Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, **35**, 546-551.

- Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A. & Feldman, E.L. (2010) How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nature Reviews Neurology*, **6**, 551-559.
- Singh, B.S., Rajakumar, P.A., Eves, E.M., Rosner, M.R., Wainer, B.H. & Devaskar, S.U. (1997) Insulin gene expression in immortalized rat hippocampal and pheochromocytoma-12 cell lines. *Regulatory peptides*, **69**, 7-14.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S.-I., Merlini, G., Saraiva, M.J. & Westermark, P. (2010) Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, **17**, 101-104.
- Sipe, J.D. & Cohen, A.S. (2000) Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology*, **130**, 88-98.
- Sisodia, S.S. (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 6075-6079.
- Sisodia, S.S. & St George-Hyslop, P.H. (2002) γ -Secretase, Notch, A β and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 281-290.
- Smillie, K.J. & Cousin, M.A. (2011) The role of GSK3 in presynaptic function. *International Journal of Alzheimer's Disease*, **2011**.
- Snow, A.D. & Wight, T.N. (1989) Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiology of aging*, **10**, 481-497.
- Solano, D.C., Sironi, M., Bonfini, C., Solerte, S.B., Govoni, S. & Racchi, M. (2000) Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway. *The FASEB Journal*, **14**, 1015-1022.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D. & Hanan-Aharon, E. (1997) Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 4109-4112.
- Solomon, B., Koppel, R., Hanan, E. & Katzav, T. (1996) Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 452-455.
- Sood, A., Beach, J.W., Webster, S.J., Terry, A.V. & Buccafusco, J.J. (2007) The effects of JWB1-84-1 on memory-related task performance by amyloid A β transgenic mice and by young and aged monkeys. *Neuropharmacology*, **53**, 588-600.
- Sperbera, B.R., Leight, S., Goedert, M. & Lee, V.-Y. (1995) Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neuroscience letters*, **197**, 149-153.

- Steen, E., Terry, B.M., J Rivera, E., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R. & de la Monte, S.M. (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease*, **7**, 63-80.
- Stewart, S., Cacucci, F. & Lever, C. (2011) Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*, **26**, 105-126.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.-H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P. & Paganetti, P.A. (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 13287-13292.
- Sun, X., He, G., Qing, H., Zhou, W., Dobie, F., Cai, F., Staufenbiel, M., Huang, L.E. & Song, W. (2006a) Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 18727-18732.
- Sun, X., He, G. & Song, W. (2006b) BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **20**, 1369-1376.
- Sutherland, C. & Cohen, P. (1994) The α -isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS letters*, **338**, 37-42.
- Sutherland, C., Leighton, I.A. & Cohen, P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochemical Journal*, **296**, 15-19.
- Suzuki, N., Cheung, T., Cai, X., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., Golde, T. & Younkin, S. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*, **264**, 1336-1340.
- Suzuki, T. & Nakaya, T. (2008) Regulation of amyloid beta-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. *J Biol Chem*, **283**, 29633-29637.
- Takahashi, K., Niidome, T., Akaike, A., Kihara, T. & Sugimoto, H. (2008) Phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Tyr687 regulates APP processing by α - and γ -secretase. *Biochemical and biophysical research communications*, **377**, 544-549.

- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K. & Yamaguchi, H. (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25–35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neuroscience research*, **31**, 317-323.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G. & Iwatsubo, T. (2003) The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature*, **422**, 438-441.
- Talbot, K. (2014) Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and its potential treatment with GLP-1 analogs. *Neurodegenerative disease management*, **4**, 31-40.
- Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J. & Wilson, R.S. (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *The Journal of clinical investigation*, **122**, 1316-1338.
- Tan, T.C., Valova, V.A., Malladi, C.S., Graham, M.E., Berven, L.A., Jupp, O.J., Hansra, G., McClure, S.J., Sarcevic, B. & Boadle, R.A. (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nature cell biology*, **5**, 701-710.
- Taru, H., Yoshikawa, K. & Suzuki, T. (2004) Suppression of the caspase cleavage of β -amyloid precursor protein by its cytoplasmic phosphorylation. *FEBS letters*, **567**, 248-252.
- Terwel, D., Muylleert, D., Dewachter, I., Borghgraef, P., Croes, S., Devijver, H. & Van Leuven, F. (2008) Amyloid activates GSK-3 β to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *The American journal of pathology*, **172**, 786-798.
- Tesco, G., Koh, Y.H. & Tanzi, R.E. (2003) Caspase activation increases β -amyloid generation independently of caspase cleavage of the β -amyloid precursor protein (APP). *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 46074-46080.
- Tesco, G. & Tanzi, R. (2000) GSK3 β Forms a Tetrameric Complex with Endogenous PS1-CTF/NTF and β -Catenin: Effects of the D257/D385A and FAD-linked Mutations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **920**, 227-232.
- Theuns, J., Marjaux, E., Vandenbulcke, M., Van Laere, K., Kumar-Singh, S., Bormans, G., Brouwers, N., Van den Broeck, M., Vennekens, K. & Corsmit, E. (2006) Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Human mutation*, **27**, 888-896.
- Thinakaran, G. & Koo, E.H. (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 29615-29619.

- Thornton, E., Vink, R., Blumbergs, P.C. & Van Den Heuvel, C. (2006) Soluble amyloid precursor protein α reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain research*, **1094**, 38-46.
- Tomiya, T., Nagata, T., Shimada, H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M. & Ataka, S. (2008) A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Annals of neurology*, **63**, 377-387.
- Tóth, G., Gardai, S.J., Zago, W., Bertocini, C.W., Cremades, N., Roy, S.L., Tambe, M.A., Rochet, J.-C., Galvagnion, C. & Skibinski, G. (2014) Targeting the intrinsically disordered structural ensemble of α -synuclein by small molecules as a potential therapeutic strategy for Parkinson's disease. *PLoS One*, **9**, e87133.
- Twomey, C. & McCarthy, J.V. (2006) Presenilin-1 is an unprimed glycogen synthase kinase-3 β substrate. *FEBS letters*, **580**, 4015-4020.
- Tyan, S.-H., Shih, A.Y.-J., Walsh, J.J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., Eggert, S., Hof, P.R., Koo, E.H. & Dickstein, D.L. (2012) Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **51**, 43-52.
- Tyler, S.J., Dawbarn, D., Wilcock, G.K. & Allen, S.J. (2002) α -and β -secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, **299**, 373-376.
- Uemura, K., Kuzuya, A., Shimozono, Y., Aoyagi, N., Ando, K., Shimohama, S. & Kinoshita, A. (2007) GSK3 β activity modifies the localization and function of presenilin 1. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 15823-15832.
- Ugi, S., Imamura, T., Ricketts, W. & Olefsky, J.M. (2002) Protein phosphatase 2A forms a molecular complex with Shc and regulates Shc tyrosine phosphorylation and downstream mitogenic signaling. *Molecular and cellular biology*, **22**, 2375-2387.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S. & Chen, E. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo j*, **5**, 2503-2512.
- Underwood, E. (2015) Alzheimer's amyloid theory gets modest boost. *Science*, **349**, 464-464.
- Urano, T. & Tohda, C. (2010) Icaritin improves memory impairment in Alzheimer's disease model mice (5xFAD) and attenuates amyloid β -induced neurite atrophy. *Phytotherapy Research*, **24**, 1658-1663.

- Uversky, V.N. (2012) Intrinsically disordered proteins and novel strategies for drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, **7**, 475-488.
- Vaessen, N., Heutink, P., Janssen, J.A., Witteman, J.C., Testers, L., Hofman, A., Lamberts, S.W., Oostra, B.A., Pols, H.A. & van Duijn, C.M. (2001) A polymorphism in the gene for IGF-I functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes*, **50**, 637-642.
- Valente, T., Gella, A., Fernández-Busquets, X., Unzeta, M. & Durany, N. (2010) Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiology of disease*, **37**, 67-76.
- Van Broeckhoven, C., Backhovens, H., Cruts, M., De Winter, G., Bruyland, M., Cras, P. & Martin, J.-J. (1992) Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24. 3. *Nature genetics*, **2**, 335-339.
- Van Dam, D., D'hooge, R., Staufenbiel, M., Van Ginneken, C., Van Meir, F. & De Deyn, P.P. (2003) Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *European Journal of Neuroscience*, **17**, 388-396.
- Van Dam, D. & De Deyn, P.P. (2006) Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**, 956-970.
- van der Kant, R. & Goldstein, L.S. (2015) Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Developmental cell*, **32**, 502-515.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P. & Loeloff, R. (1999) β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *science*, **286**, 735-741.
- Vassar, R. & Citron, M. (2000) A β -generating enzymes: recent advances in β - and γ -secretase research. *Neuron*, **27**, 419-422.
- Velliquette, R.A., O'Connor, T. & Vassar, R. (2005) Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci*, **25**, 10874-10883.
- Vergès, B. (2015) Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*, **58**, 886-899.
- Viatour, P., Merville, M.-P., Bours, V. & Chariot, A. (2005) Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in biochemical sciences*, **30**, 43-52.

- Volianskis, A., Køstner, R., Mølgaard, M., Hass, S. & Jensen, M.S. (2010) Episodic memory deficits are not related to altered glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the CA1 hippocampus of the APP^{swe}/PS1 Δ E9-deleted transgenic mice model of β -amyloidosis. *Neurobiology of aging*, **31**, 1173-1187.
- von Arnim, C.A., Kinoshita, A., Peltan, I.D., Tangredi, M.M., Herl, L., Lee, B.M., Spoelgen, R., Hshieh, T.T., Ranganathan, S. & Battey, F.D. (2005) The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel β -secretase (BACE1) substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 17777-17785.
- Wakutani, Y., Watanabe, K., Adachi, Y., Wada-Isoe, K., Urakami, K., Ninomiya, H., Saido, T., Hashimoto, T., Iwatsubo, T. & Nakashima, K. (2004) Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **75**, 1039-1042.
- Walker, J.M., Dixit, S., Saulsberry, A.C., May, J.M. & Harrison, F.E. (2017) Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, β -amyloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, **100**, 87-98.
- Walsh, D.M., Fadeeva, J.V., LaVoie, M.J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W.T., Wasco, W. & Selkoe, D.J. (2003) γ -Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry*, **42**, 6664-6673.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M. & Teplow, D.B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem*, **272**, 22364-22372.
- Walsh, D.M. & Teplow, D. (2012) Alzheimer's disease and the amyloid b-protein. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **107**, 101-124.
- Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.-Y. (1999) The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Experimental neurology*, **158**, 328-337.
- Wang, J.Z., Xia, Y.Y., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2013) Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **33 Suppl 1**, S123-139.
- Wang, Q., Jia, J., Qin, W., Wu, L., Li, D., Wang, Q. & Li, H. (2015a) A Novel A β PP M722K Mutation Affects Amyloid- β Secretion and Tau Phosphorylation and May Cause Early-Onset Familial Alzheimer's Disease in Chinese Individuals. *Journal of Alzheimer's Disease*, **47**, 157-165.

- Wang, X.-J., Cao, Q., Zhang, Y. & Su, X.-D. (2015b) Activation and regulation of caspase-6 and its role in neurodegenerative diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **55**, 553-572.
- Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z. & Zheng, H. (2009) Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 10788-10801.
- Ward, A., Tardiff, S., Dye, C. & Arrighi, H.M. (2013) Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra*, **3**, 320-332.
- Webb, R.L. & Murphy, M.P. (2012) beta-Secretases, Alzheimer's Disease, and Down Syndrome. *Curr Gerontol Geriatr Res*, **2012**, 362839.
- Webster, M.-T., Pearce, B., Bowen, D. & Francis, P. (1998) The effects of perturbed energy metabolism on the processing of amyloid precursor protein in PC12 cells. *Journal of neural transmission*, **105**, 839-853.
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A. & Van Eldik, L.J. (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in genetics*, **5**, 88.
- Wei, J., Liu, W. & Yan, Z. (2010a) Regulation of AMPA receptor trafficking and function by glycogen synthase kinase 3. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 26369-26376.
- Wei, W., Nguyen, L.N., Kessels, H.W., Hagiwara, H., Sisodia, S. & Malinow, R. (2010b) Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nature neuroscience*, **13**, 190-196.
- Wei, W., Norton, D.D., Wang, X. & Kusiak, J.W. (2002) A β 17–42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain*, **125**, 2036-2043.
- Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G. & Ashe, K.H. (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **22**, 1858-1867.
- Westermarck, P., Wernstedt, C., Wilander, E. & Sletten, K. (1986) A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochemical and biophysical research communications*, **140**, 827-831.
- White, M.F. (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, **283**, E413-E422.

- Wilcock, D.M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Subbarao, S., Freeman, M.J., Gordon, M.N. & Morgan, D. (2004) Passive immunotherapy against A β in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *Journal of neuroinflammation*, **1**, 1.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. (2004) Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*, **27**, 1047-1053.
- Wild-Bode, C., Fellerer, K., Kugler, J., Haass, C. & Capell, A. (2006) A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *Journal of biological chemistry*, **281**, 23824-23829.
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C. & Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science*, **314**, 664-666.
- Willette, A.A., Modanlo, N., Kapogiannis, D. & Initiative, A.s.D.N. (2015) Insulin resistance predicts medial temporal hypermetabolism in MCI conversion to Alzheimer's disease. *Diabetes*, db141507.
- Wolfe, M.S. (2013) Toward the structure of presenilin/ γ -secretase and presenilin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1828**, 2886-2897.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T. & Selkoe, D.J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*, **398**, 513-517.
- Wong, H.-K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P. & Nukina, N. (2005) β Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and γ -secretase. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 23009-23017.
- Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D. & Porte, D. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons.
- Wu, X., Reiter, C.E., Antonetti, D.A., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. & Gardner, T.W. (2004) Insulin promotes rat retinal neuronal cell survival in a p70S6K-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 9167-9175.
- Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Hirai, S., Shoji, M. & Harigaya, Y. (1989) Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *The American journal of pathology*, **135**, 593.

- Yang, S.D., Song, J.S., Yu, J.S. & Shiah, S.G. (1993) Protein Kinase FA/GSK-3 Phosphorylates on Ser235-Pro and Ser404-Pro that Are Abnormally Phosphorylated in Alzheimer's Disease Brain. *Journal of neurochemistry*, **61**, 1742-1747.
- Yang, Y. & Song, W. (2013) Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience*, **250**, 140-150.
- Yarchoan, M., Toledo, J.B., Lee, E.B., Arvanitakis, Z., Kazi, H., Han, L.-Y., Louneva, N., Lee, V.M.-Y., Kim, S.F. & Trojanowski, J.Q. (2014) Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies. *Acta neuropathologica*, **128**, 679-689.
- Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J. & Selkoe, D.J. (2007) A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci*, **27**, 14459-14469.
- Yu, W., Kumar, A., Peterhoff, C., Kulnane, L.S., Uchiyama, Y., Lamb, B., Cuervo, A. & Nixon, R. (2004) Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for β -amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **36**, 2531-2540.
- Yuan, Y., Gu, Z.-X. & Wei, W.-S. (2009) Fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography, single-photon emission tomography, and structural MR imaging for prediction of rapid conversion to Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment: a meta-analysis. *American Journal of Neuroradiology*, **30**, 404-410.
- Zajac, J., Shrestha, A., Patel, P. & Poretsky, L. (2010) The main events in the history of diabetes mellitus *Principles of diabetes mellitus*. Springer, pp. 3-16.
- Zeggini, E., Weedon, M.N., Lindgren, C.M., Frayling, T.M., Elliott, K.S., Lango, H., Timpson, N.J., Perry, J.R., Rayner, N.W. & Freathy, R.M. (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, **316**, 1336-1341.
- Zekonyte, J., Sakai, K., Nicoll, J.A., Weller, R.O. & Carare, R.O. (2016) Quantification of molecular interactions between ApoE, amyloid-beta (A β) and laminin: Relevance to accumulation of A β in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1862**, 1047-1053.
- Zhang, S., Zhang, M., Cai, F. & Song, W. (2013) Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Translational neurodegeneration*, **2**, 1.
- Zhao, L., Teter, B., Morihara, T., Lim, G.P., Ambegaokar, S.S., Ubeda, O.J., Frautschy, S.A. & Cole, G.M. (2004a) Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin

receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *The Journal of neuroscience*, **24**, 11120-11126.

Zhao, M., Su, J., Head, E. & Cotman, C.W. (2003) Accumulation of caspase cleaved amyloid precursor protein represents an early neurodegenerative event in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, **14**, 391-403.

Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M.J. & Alkon, D.L. (1999) Brain insulin receptors and spatial memory correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 34893-34902.

Zhao, W.-Q., Chen, H., Quon, M.J. & Alkon, D.L. (2004b) Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *European journal of pharmacology*, **490**, 71-81.

Zhao, W.-Q. & Townsend, M. (2009) Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1792**, 482-496.

Zhou, L., Brouwers, N., Benilova, I., Vandersteen, A., Mercken, M., Van Laere, K., Van Damme, P., Demedts, D., Van Leuven, F. & Sleegers, K. (2011) Amyloid precursor protein mutation E682K at the alternative β -secretase cleavage β' -site increases A β generation. *EMBO molecular medicine*, **3**, 291-302.

Zhou, Y., Zhao, Y., Xie, H., Wang, Y., Liu, L. & Yan, X. (2015) Alteration in amyloid beta42, phosphorylated tau protein, interleukin 6, and acetylcholine during diabetes-accelerated memory dysfunction in diabetic rats: correlation of amyloid beta42 with changes in glucose metabolism. *Behavioral and brain functions : BBF*, **11**, 24.